



ciberer
Centro de Investigación Biomédica En Red
de Enfermedades Raras

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular
Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM)
Centro de Investigación Biomédica en Red de
Enfermedades Raras (CIBERER, ISCIII)

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LA β -F1-RNP Y SU RELEVANCIA EN CÁNCER

Memoria presentada por el licenciado
Álvaro D. Ortega Moreno
para optar al grado de
Doctor en Biología Molecular
por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis: **Dr. José Manuel Cuezva Marcos**

Madrid, 2008

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio del Doctor José Manuel Cuezva Marcos, Catedrático del Departamento de Biología Molecular del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid (Enero 2003-Marzo 2008). Durante este periodo, el licenciado Álvaro D. Ortega Moreno ha disfrutado de una beca (Enero 2003-Diciembre 2004) / contrato (Enero 2005-Diciembre 2006) predoctoral del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario del MEC y de un contrato de investigador (Enero 2007-Marzo 2008) del CIBERER (Instituto de Salud Carlos III, MSC).

José Manuel Cuezva Marcos, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid,

INFORMA:

Que el doctorando **D. ÁLVARO D. ORTEGA MORENO** ha realizado durante los últimos cinco años bajo mi dirección, y en el *Departamento de Biología Molecular*, el trabajo original de investigación titulado **“Identificación molecular y funcional de la β -F1-RNP y su relevancia en cáncer”** que presenta para optar al grado de Doctor en Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid.

Los resultados obtenidos por Álvaro Ortega aportan nuevos datos de gran interés sobre la participación de la mitocondria en cáncer así como de los mecanismos que controlan la actividad de este orgánulo en la célula. Específicamente, en una primera parte de la tesis los resultados ilustran que la expresión relativa de la proteína responsable de la función bioenergética de la mitocondria β -F1-ATPasa está reprimida en carcinomas escamosos y en adenocarcinomas de pulmón, así como en carcinomas basocelulares de piel, por mecanismos compatibles con la represión de la traducción de su mRNA. En este contexto, demuestra que la alteración de la expresión de esta proteína en cáncer proporciona: (i) una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico y la prognosis de pacientes con carcinomas de pulmón así como (ii) un indicador proteómico de la actividad funcional de la glucólisis en el tejido tumoral, suministrando una explicación molecular para la mayor captación de glucosa que se observa en los tumores.


Nuestra línea de investigación se ha centrado durante muchos años en los mecanismos moleculares que controlan la biógenesis de la mitocondria y en particular, la regulación post-transcripcional que se ejerce sobre el mRNA que codifica la subunidad catalítica de la H^+ -ATP-sintasa (β -F1-ATPasa). Un punto clave de este proyecto es la identificación y caracterización molecular de los factores que se unen al mRNA de β -F1-ATPasa. Por este motivo Álvaro Ortega, en la segunda parte de su tesis, ha desarrollado una metodología de afinidad para la purificación de las proteínas que interaccionan con β -mRNA y que previsiblemente están definiendo la localización y el destino metabólico de este mRNA en desarrollo, durante el ciclo celular y en oncogénesis, es decir, se ha profundizado en la caracterización de los mecanismos que pueden promover la alteración de la función bioenergética de la mitocondria en cáncer. La purificación e identificación de estas proteínas es un tema de gran dificultad que, finalmente, ha sido resuelto por la maestría y buen hacer del doctorando. Aplicando esta metodología y métodos inmunológicos ha caracterizado a HuR como una proteína que interacciona con el 3'UTR del mRNA de β -F1-ATPasa. Demuestra que la expresión de HuR está muy aumentada en cáncer de mama y que su nivel de expresión aporta un marcador pronóstico independiente de la supervivencia de las pacientes. Aplicando la misma metodología de afinidad y técnicas de espectrometría de masas para la identificación de las proteínas purificadas, y empleando dos sistemas experimentales distintos, ha conseguido identificar nueve proteínas de unión a mRNA y dos proteínas del

citoesqueleto como miembros de la ribonucleopartícula (β -F1-RNP) que contiene β -mRNA. En este contexto, ha estudiado más en detalle el papel funcional que IMP1, G3BP y NPM pueden desempeñar en la expresión de β -F1-ATPasa, habiendo observado que G3BP ejerce una actividad represora de la traducción de β -mRNA *in vivo* e *in vitro*. Estos resultados, además de aportar las primeras piezas del rompecabezas por las que continuaremos investigando con objeto de explicar la represión de la biogénesis mitocondrial en cáncer, tienen una utilidad directa en la línea más aplicada de nuestro laboratorio, que está encaminada a la identificación y caracterización de marcadores moleculares del metabolismo energético de utilidad para el diagnóstico y pronóstico del cáncer y de otras patologías humanas que implican una disfunción de la mitocondria. Por último, Álvaro Ortega ha desarrollado una estrategia molecular, para la que se ha solicitado la correspondiente patente, que permite la interferencia con la actividad de la H^+ -ATP sintasa. Esta aproximación es la base experimental que se está utilizando para el desarrollo de modelos animales de patología mitocondrial por fallo en la función bioenergética del orgánulo.

Quiero resaltar que estos resultados son pioneros en este campo de investigación y que han contribuido y contribuirán al desarrollo de nuevas vías de investigación relacionadas con el papel de la mitocondria en progresión tumoral y eventualmente haciendo de este orgánulo una diana terapéutica para atajar la enfermedad. Parte de los resultados obtenidos han sido ya objeto de publicación en artículos científicos (*Biochem J* 378: 17-20 (2004), *J Bioenerg Biomembr* 39: 259-265 (2007), *Cancer Res* 67:9013-9017 (2007) y un capítulo de libro "*Mitochondria in Cancer Biology*" (2005) y en diversas contribuciones a congresos nacionales e internacionales. Además, a fecha de hoy, tiene enviados otros dos artículos sobre la temática de la tesis y está pendiente el envío de otra revisión por invitación a *Cancer Lett*. Otros resultados de la tesis serán objeto de publicación en el próximo futuro. Asimismo, es autor de una patente derivada del trabajo de su tesis sobre IF1 (nº P200701319) y ha colaborado en el desarrollo de otras investigaciones del laboratorio (*PLoS ONE* 1: e107 (2006)) así como en la escritura de otro capítulo de libro (*Brain Damage and Repair*, 2004) sobre el papel de la mitocondria en enfermedades neurodegenerativas.

Por todo lo anterior, y dadas las aportaciones originales de este trabajo y la madurez científica que a mi juicio acredita Álvaro D. Ortega Moreno, considero que puede procederse a la presentación y defensa de esta Memoria.

Lo que hago constar a los efectos oportunos en Madrid, a 3 de marzo de 2008



José Manuel Cuezva Marcos

A mi madre
por conseguir un sueño a base esfuerzo

*Asesinado por el cielo.
Entre las formas que van hacia la sierpe
y las formas que buscan el cristal
dejaré crecer mis cabellos.
[...]
Con todo lo que tiene cansancio sordomudo
y mariposa ahogada en el tintero.
Tropezando con mi rostro distinto de cada día.
¡Asesinado por el cielo!*

Federico García Lorca

Cuando canto a gusto me sabe la boca a sangre

Tía Anica la Periñaca

En primer lugar, quiero agradecer sinceramente a Pepe Cuezva haberme acogido en su línea de investigación y haberme dado su confianza. En estos años, he aprendido a hacer ciencia desde la poyata pero estoy especialmente agradecido por haberme hecho entender la relevancia de lo que hay más allá de ella.

Para llevar a cabo esta tesis, ha sido imprescindible la colaboración y el trabajo de muchas personas. Quiero destacar al Dr. Manuel González Barón y al equipo que dirige en el Hospital La Paz, por la colección de muestras de pacientes de carcinoma de mama y por los datos clínicos y de seguimiento de las pacientes. Quiero agradecer al Dr. Fernando López-Ríos y todos los médicos del Hospital Doce de Octubre que han colaborado en la elaboración de los análisis por inmunohistoquímica de las muestras de carcinomas de pulmón, los análisis de FDG-PET y la recopilación de las historias clínicas de los pacientes. Quiero agradecer al Dr. Pedro Fernández, del IDIBAPS en el Hospital Clinic, por suministrarnos las muestras de carcinomas de pulmón y de tejido normal del mismo paciente.

Asimismo, otros investigadores han aportado herramientas necesarias para abordar ciertas aproximaciones experimentales. En este sentido, quiero agradecer a la Dra. Robin Reed, de Harvard Medical School, por habernos suministrado los plásmidos de la proteína MBP-CP y del clon MS2 y al Dr. Keneth S. Kosik, de Harvard Medical School, por habernos facilitado los plásmidos para expresar la GFP-CP y β -galactosidasa-MS2.

Estoy muy agradecido al personal de los servicios generales y científicos y a las instituciones que les dan soporte, ya que su profesionalidad ha agilizado enormemente nuestro trabajo. Entre ellos, quiero destacar la labor de Emilio Camafeita, del S^o de Proteómica del CNIC, la de Fernando Carrasco y Aitor Sánchez, del S^o de Genómica del CBM, la de Maite Rejas, del S^o de Microscopía Electrónica del CBM y la de Juan Rebelles, del S^o de Cultivos del CBM.

Durante estos años, he recibido la ayuda profesional y personal de muchas personas con las que he compartido laboratorio y he tenido una relación muy cordial. Pero quiero agradecer de forma especial a algunos de ellos. Nunca podré acostumbrarme a la ausencia de mis hermanos mayores del CX-101: Gema, Marta, Antonio y Paloma. Todavía me siento muy unido a vosotros, por lo que me he reído (y lo que habéis disfrutado picándome), por la cantidad de cosas que hemos compartido y por todo lo que he aprendido de cada uno de vosotros. La ayuda altruista de mis hermanas pequeñas, María y Sandra, igualitas como dos gotas de agua, ha sido fundamental. Sin ese empujón en el tren de la una y los disgustos que me daba la otra, no podría haber llegado aquí y ahora. Por favor, no olvidéis la institución de las cañas (mirada del tigre incluida). Gracias a mis compañeros del lab. 326, por la demencia y alegría de Inés y Dani, y el buen carácter de Imke y Laura. Y por último, gracias a Margarita, porque es realmente la única persona cuerda y el centro de gravedad del laboratorio. Porque sin Margarita no habría duende, y como en el flamenco, ésa es la vía para llegar donde otros no pueden llegar.

Agradecimientos

El CBM es un espacio común donde se coincide con mucha gente. Mi agradecimiento a mis queridos funcionarios, Juan Rebelles, por tu sensibilidad artística y social y por lo que hemos disfrutado con la música, y a Enrique Núñez y María Chorro, por vuestro entusiasmo y afán de superación. Gracias a los primos del 450 (o del 321), y en especial a Elise y Alanín, por la alegría que se llevan cuando voy a verles.

El camino para llegar aquí pasó por una carrera con muchas horas de clase que sobrellevábamos entre todos. Gracias, Pablo e Inma, por tantas comidas y tantas fiestas, qué fácil es estar siempre de acuerdo con vosotros. Y especialmente, a mi hermana de luna Esther y a mi primo Fernando, por hacer que todo saliera tan bien.

Gracias a mis amigos. Después de más de 20 años creo que no queda nada que no os pueda agradecer y pocas cosas vuestras de las que no me pueda enorgullecer. Y gracias a los de Garrucha, porque hemos conseguido convertir una comarca en un paraíso.

A mi familia, que aunque bastante perdida en cuanto al funcionamiento a veces absurdo del mundo de la investigación (¿tienes colegio mañana?), me han apoyado ciegamente. Siento que al final el título de la tesis sea medianamente inteligible, sé que os habría encantado no entender ni una sola palabra.

Y gracias especialmente a ti, por enseñarme a querer y por llenar mi casa y mi vida de alegría.

$\Delta\mu\text{H}^+$	Gradiente electroquímico de protones
$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana de la mitocondria
ACL	ATP citrato liasa
AMPK	Proteína quinasa dependiente de AMP
BCC	Carcinoma basocelular de piel
BEC	Índice bioenergético celular
β-mRNA	mRNA de la subunidad β -F1-ATPasa
rβ-MS2	β -mRNA de rata mutante con el 3'UTR interrumpido con la secuencia MS2h
β-F1-RNP	Ribonucleopartícula del mRNA de β -F1-ATPasa
C4	Modelo celular de represión traduccional. Línea celular derivada de NRK que expresa establemente β -MS2
CP	Proteína de la cápsida del virus bacteriófago MS2
Ct	Extremo carboxilo terminal
EF	Electroforesis
EMSA	Ensayo de retardo de la movilidad electroforética de una sonda (electrophoretic mobility shift assay)
^{18}FDG	2-[^{18}F]-2-desoxi-D-glucosa
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Green fluorescent protein
HIF1α	Factor inducible por hipoxia 1 α
His-MBP-CP	MBP-CP que tiene insertado en fase 5 Histidinas en su extremo amino terminal
Hsp60	60 kDa heat sock protein
IC	Intervalo de confianza
IHQ	Inmunohistoquímica
IP	Inmunoprecipitado o Inmunoprecipitación
LAC	Adenocarcinoma de pulmón
LDHA	Lactato deshidrogenasa A
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight
MBP-CP	Proteína de fusión que comprende la proteína de unión a maltosa de <i>E. coli</i> (codificada por el gen <i>MalE</i>) fusionada en fase a la CP de MS2
MS2h	Horquillas MS2; secuencias de unión a la CP de MS2
MS/MS	Mass spectrometry/Mass spectrometry

mtDNA	DNA mitocondrial
nDNA	DNA nuclear
NT	Células no transfectadas (control)
Nt	Extremo amino terminal
OAA	Oxalacetato
ORF	Marco abierto de lectura
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDK1	Piruvato deshidrogenasa quinasa 1
PET	Tomografía de emisión de positrones
PK	Piruvato quinasa
PPP	Vía de las pentosas fosfato
Pyr	Piruvato
RNABP	Proteína de unión a RNA
RNP	Ribonucleopartícula
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S.E.M.	Error típico de la media
SLC	Carcinoma escamoso de pulmón
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SG	Supervivencia global
SUV	Standardized uptake value
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
UTR	Región no traducida
UVXL	UV-cross linking

ÍNDICE DE CONTENIDO

SUMMARY	1
INTRODUCCIÓN	5
1. El cáncer	7
2. Metabolismo energético de las células tumorales	9
2.1. Avidéz por glucosa de la célula tumoral	12
2.2. Bases moleculares del fenotipo glucolítico de la célula tumoral	13
2.2.1 Oncogenes e hipoxia	13
2.2.2. Alteraciones de la función mitocondrial	16
2.2.3. El fenotipo metabólico de la célula proliferante	18
3. Metabolismo energético y biogénesis mitocondrial	19
OBJETIVOS	23
MATERIAL Y MÉTODOS	27
1. Material	29
1.1. Muestras humanas	29
1.2. Líneas celulares	30
1.3. Animales de experimentación	30
1.4. Cepas bacterianas	30
1.5. Plásmidos	31
1.6. Oligonucleótidos	31
1.7. Radioisótopos	34
2. Métodos	34
2.1. Biología molecular	34
2.1.1. Aislamiento de DNA de cultivos bacterianos	34
2.1.2. Cuantificación, calidad, ingeniería y electroforesis (EF) de DNA	34
2.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	36
2.1.3.1. Amplificación para clonaciones	36
2.1.3.2. PCR inversa	36
2.1.3.3. Mutagénesis dirigida	36
2.1.3.4. Cribado de clones recombinantes	37
2.1.3.5. Producción de molde para síntesis in vitro de macromoléculas y ribosondas	37
2.1.3.6. RT-PCR	37
2.1.3.7. PCR cuantitativa (qPCR) y semi-qPCR	38
2.1.4. Clonaciones	38
2.1.4.1. RNAs híbridos (hRNAs)	38

2.1.4.2. His-MBP-CP	39
2.1.4.3. IF1-H49K	39
2.1.4.4. rβ-MS2	40
2.1.4.5. βGal-3'β-MS2	40
2.1.5. Expresión de proteínas recombinantes en bacterias	40
2.1.6. Detección específica de RNA (Northern y slot blot)	41
2.2. Bioquímica de proteínas	42
2.2.1. Extracción de proteínas de muestras biológicas	42
2.2.2. Cuantificación de proteínas	42
2.2.3. Electroforesis de proteínas mono (SDS-PAGE), bi-dimensional (IEF-SDS-PAGE) y en condiciones nativas.	43
2.2.4. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.	44
2.2.5. Detección inmunológica de proteínas (Western blot , WB)	44
2.2.6. Fluorografía de proteínas marcadas en geles de poliacrilamida	46
2.2.7. Purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad.	46
2.2.8. Cromatografía de exclusión molecular	48
2.2.9. Cromatografía de intercambio iónico	48
2.2.10. Identificación de proteínas por espectrometría de masas	48
2.3. Ensayos in vitro de síntesis e interacción de macromoléculas	50
2.3.1. Transcripción in vitro y producción de ribosondas.	50
2.3.2. Traducción in vitro	50
2.3.3. Síntesis in vitro de proteínas en un sistema eucariótico de transcripción-traducción acopladas	51
2.3.4. Ensayos in vitro de interacción RNA-proteína	51
2.3.5. Purificación de proteínas de unión a RNA (RNA-BPs) a partir de extractos celulares.	52
2.4. Biología celular	53
2.4.1. Mantenimiento de líneas celulares establecidas en cultivo	53
2.4.2. Extracción de DNA genómico, RNA y proteína de cultivos celulares	53
2.4.3. Fraccionamiento subcelular por ultra-centrifugación en gradiente de densidad	54
2.4.4. Transfección de plásmidos	54
2.4.5. Generación de líneas celulares establemente transfectadas.	55
2.4.6. Citometría de flujo.	55
2.4.7. Microscopía de fluorescencia	55
2.4.8. Inmunomicroscopía electrónica	56
2.4.9. Medida del flujo glucolítico	57
2.4.10. Medida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$).	57

2.4.11. Marcaje metabólico de proteínas en células en cultivo.	58
2.4.12. Velocidad de síntesis de proteínas <i>in vivo</i>	58
2.4.13. Inmunoprecipitación (IP).	58
2.4.14. Análisis de interacción RNA-proteína <i>in vivo</i> (RIP)	59
2.4.15. Localización de RNA <i>in vivo</i>	59
RESULTADOS	61
1. Fenotipo bioenergético en tumores humanos.	63
1.1. Carcinomas basocelulares de piel (BCC).	63
1.2. Carcinomas de pulmón.	65
1.2.1. Adenocarcinomas (LAC) y carcinomas escamosos de pulmón (SLC).	65
1.2.2. Relevancia fisiológica y clínica del fenotipo bioenergético en carcinomas de pulmón.	68
1.2.2.1. La pérdida de la capacidad bioenergética de la mitocondria correlaciona con un aumento del metabolismo glucolítico.	68
1.2.2.2. Valor diagnóstico y pronóstico del fenotipo bioenergético.	70
2. HuR es una proteína de unión al mRNA de β-F1-ATPasa que predice el riesgo de recidiva del cáncer de mama.	73
2.1. HuR es una proteína de unión al mRNA de β -F1-ATPasa.	73
2.1.1. HuR interacciona con el mRNA de β -F1-ATPasa en células humanas.	73
2.1.2. HuR interacciona <i>in vitro</i> con el 3'UTR del mRNA de β -F1-ATPasa.	74
2.1.3. HuR interacciona, cofracciona y colocaliza con el complejo ribonucleoproteico del mRNA de β -F1-ATPasa en células de rata.	76
2.2. Relevancia de HuR en tumores de mama	78
2.2.1. HuR se encuentra sobre-expresado en tumores de mama.	78
2.2.2. HuR y la huella bioenergética del cáncer.	79
2.2.3. HuR es un marcador independiente de progresión del cáncer de mama.	79
2.3. La sobre-expresión de HuR en células humanas no afecta la expresión de β -F1-ATPasa.	83
3. Purificación e identificación de las proteínas que se unen a β-mRNA.	85
3.1. Desarrollo del método de purificación de RNABPs.	85
3.1.1. Implementación inicial de un método descrito.	85
3.1.2. Generación de una MS2-coat-protein pura y funcional con dos etiquetas de afinidad.	87
3.1.3. Bases de la interacción RNA-RNABPs.	90
3.1.4. La elución con RNasa A.	92
3.1.5. Esquema de la estrategia experimental.	93
3.2. Purificación e identificación de las β -mRNABPs.	93

3.2.1. Purificación e identificación de las β -mRNABPs.	93
3.2.2. Funcionalidad de las β -mRNABPs en la expresión de β -mRNA. . . .	96
4. Modelos celulares de represión de la función bioenergética de la mitocondria.	102
4.1. Modelo celular de inhibición funcional de la actividad de la H^+ -ATP-sintasa: sobre-expresión del inhibidor fisiológico IF1.	102
4.1.1. Relevancia del metabolismo energético mitocondrial en células en cultivo.	103
4.1.2. La sobre-expresión de IF1 y H49K provoca un aumento del flujo glucolítico de las células.	104
4.1.3. Efecto de la sobre-expresión de IF1 y H49K en el potencial de membrana de la mitocondria.	104
4.2. Modelo celular de represión traduccional de β -mRNA.	105
4.2.1. Generación del modelo celular.	107
4.2.2. Inhibición específica de traducción de β -mRNA en las células C4. . .	108
4.2.3. β -MS2 se acumula en gránulos citoplasmáticos de gran tamaño. . .	109
4.2.4. β -MS2 interacciona <i>in vivo</i> con proteínas del citoesqueleto.	112
DISCUSIÓN	115
1. La alteración del fenotipo bioenergético es una característica de la célula tumoral	117
2. Bases moleculares de la huella bioenergética: regulación post-transcripcional de la expresión de β-mRNA	121
2.1. Desarrollo de una metodología de purificación de β -mRNABPs.	121
2.2. Las β -mRNABPs son proteínas multifuncionales de RNPs dinámicas. . .	124
2.3. Relevancia fisiológica de las β -mRNABPs identificadas.	132
2.4. β -mRNA-RNP y citoesqueleto.	135
CONCLUSIONES.	137
BIBLIOGRAFÍA	141
ANEXO I.	165
Material suplementario A1: Resultados de la identificación proteómica de las β -mRNABPs por MALDI-TOF y MS/MS.	171
Material suplementario A2: Revisión bibliográfica sobre las β -mRNA-BPs . .	187
ANEXO II	193
Publicaciones	195
Manuscritos enviados.	213

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I1: Metabolismo glucolítico y mitocondrial	10
Figura I2: El efecto Warburg en cáncer.	14
Figura I3: El efecto Pasteur durante el desarrollo del hígado de rata	20
Figura 1: Análisis del fenotipo bioenergético celular en carcinoma basocelular de piel (BCC)	64
Figura 2: Análisis de los niveles de mRNA de los marcadores del fenotipo bioenergético celular en BCC.	65
Figura 3: Análisis del fenotipo bioenergético celular en carcinomas de pulmón.	66
Figura 4: Niveles de mRNA de los marcadores del fenotipo bioenergético de carcinomas de pulmón	67
Figura 5: Análisis de la huella bioenergética en carcinomas de pulmón con EP-CLUST	70
Figura 6: Análisis de la alteración del fenotipo bioenergético en adenocarcinoma (LAC) y carcinoma escamoso de pulmón (SLC)	71
Figura 7: Análisis de la supervivencia de pacientes con carcinoma de pulmón.	72
Figura 8: HuR interacciona con el mRNA de β -F1-ATPasa en células humanas	73
Figura 9: HuR interacciona con el 3'UTR del mRNA de β -F1-ATPasa	75
Figura 10: HuR forma parte del complejo ribonucleoproteico de β -mRNA que está asociado a las mitocondrias	77
Figura 11: HuR está sobre-expresado en tumores de mama	78
Figura 12: La expresión de HuR correlaciona con la alteración de la huella bioenergética de tumores de mama y es relevante en progresión tumoral	80
Figura 13: La sobre-expresión de HuR no afecta a la expresión de β -F1-ATPasa	83
Figura 14: Efecto de la sobre-expresión de HuR en la síntesis in vivo de β -F1-ATPasa	84
Figura 15: Implementación inicial para la purificación de β -RBPs de un método descrito por Zhou y Reed	86
Figura 16: Expresión y purificación de His-MBP-CP	88
Figura 17: Caracterización de His-MBP-CP en la estrategia de purificación de RBPs	89
Figura 18: Caracterización de la interacción de las proteínas de unión a β -mRNA	91

Figura 19: His-MBP-CP interacciona inespecíficamente con multitud de proteínas celulares	92
Figura 20: Esquema de la estrategia de purificación de las proteínas celulares que se unen a β -mRNA.	94
Figura 21: Purificación e identificación de las proteínas que se unen a β -mRNA	95
Figura 22: Interacción in vitro de β -mRNA y RBPs	97
Figura 23: No hay evidencias de interacción in vitro de algunas de las proteínas identificadas con β -mRNA	98
Figura 24: Traducción in vitro de β -mRNA en presencia de las RBPs	99
Figura 25: Efecto de la sobre-expresión de las proteínas identificadas en la síntesis in vivo de β -mRNA	100
Figura 26: Efecto de la sobre-expresión de las β -mRNABPs en los niveles de β -mRNA.	101
Figura 27: Clonaje del mutante de IF1 H49K	102
Figura 28: Relevancia del metabolismo energético mitocondrial en células NRK	103
Figura 29: Efecto de la sobre-expresión de IF1 y H49K en el metabolismo energético de células NRK	105
Figura 30: Generación de un modelo celular de represión traduccional de β -mRNA en células NRK	106
Figura 31: Expresión de β -F1-ATPasa en el modelo celular C4	108
Figura 32: Inhibición específica de la traducción de r β -MS2 en células C4.	109
Figura 33: Localización subcelular de r β -MS2 in vivo en células C4	110
Figura 34: Localización subcelular de β -mRNA en células C4 en gradientes de sacarosa 15-40%.	111
Figura 35: Purificación de las proteínas que interaccionan con r β -MS2 in vivo	112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla MM1: Oligonucleótidos	33
Tabla MM2: Anticuerpos	45
Tabla 1: Análisis de la correlación entre los marcadores de la huella bioenergética, la $SUV_{máx}$ y el tamaño de tumores de pulmón	69
Tabla 2: Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en grupos de buen pronóstico de pacientes estratificadas por los niveles de expresión de HuR.	81
Tabla 3: Análisis multivariante de la supervivencia libre de enfermedad de pacientes con tumores de mama	82
Tabla 4: Resumen de las proteínas celulares identificadas que se unen específicamente a β -mRNA	96
Tabla 5: Resumen de las proteínas celulares identificadas que se unen específicamente a $r\beta$ -MS2	113
Tabla D1: Resumen de las características más relevantes de las β -mRNABPs identificadas	126
Tabla D2: Presencia de las β -mRNABPs identificadas en RNPs	128
Tabla A1: Resumen de las características clínico-patológicas de la cohorte de pacientes estudiados	167
Tabla A2: Resumen de las características clínico-patológicas y de la expresión de HuR de la cohorte de pacientes de adenocarcinoma de mama estudiados	168
Tabla A3: Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad (SLE) de la cohorte de pacientes	169

SUMMARY

Mitochondria play essential roles in cellular physiology participating among other activities in the supply of cellular energy, the execution of cell death and calcium and ROS signaling. Mitochondrial impairment has been reported in a growing number of human pathologies, including cancer. Cancer cells display, in the presence of oxygen, an abnormal enhanced glycolytic phenotype. This characteristic of the cancer cell prompted Otto Warburg to suggest that cancer cell mitochondria should have a bioenergetic impairment. In this thesis, we contribute to the characterization of the role of mitochondria in cancer biology. In particular, we have studied the relative expression level of mitochondrial and glycolytic proteins that are markers of the so-called bioenergetic signature. In agreement with previous findings, the bioenergetic signature of skin basocellular carcinomas and adenocarcinomas and squamous carcinomas of the lung is diminished when compared to paired normal tissue samples of the same patients, supporting the original Warburg's formulation. ¹⁸FDG-PET imaging of lung carcinomas revealed that the bioenergetic signature is significantly associated to the rate of glucose uptake by the tumor. Remarkably, we demonstrate that β -F1-ATPase expression, the standardized glucose uptake value and tumor stage are independent markers of prognosis.

β -F1-ATPase mRNA (β -mRNA) translation is tightly regulated in mammalian development, during the cell cycle and in hepatocarcinogenesis. Interestingly, we show that the repression of β -F1-ATPase expression observed in human cancers is apparently exerted at post-transcriptional levels. Control of β -mRNA localization and translation is exerted by a set of presently uncharacterized and tissue-specifically expressed β -mRNA binding proteins (β -mRNABPs). Here, we describe the development and implementation of an affinity chromatography method for the purification of specific β -mRNABPs from mammalian cells. The innovations of the approach are: (i) the recombinant protein used for the purification of the β -mRNA-protein complexes includes an additional affinity binding domain and (ii) the proteins bound to the target RNA used as bait are eluted by RNase digestion. The application of this technology in combination with the immunological identification of the eluted proteins revealed that HuR interacts both *in vitro* and *in vivo* with the regulatory 3' untranslated region of β -mRNA. HuR is highly increased in breast carcinomas and its expression levels are significantly associated with the progressive alteration of the bioenergetic signature in breast cancer patients. Furthermore, we show that HuR expression provides an independent marker of tumor progression. However, no evidences have been obtained that could support the specific involvement of HuR in β -mRNA post-transcriptional expression in human cells. The application of the affinity purification method with standard proteomic approaches (MALDI-TOF,

Summary

MS/MS) allowed the identification of DHX9, SFPQ, NonO, NCL, NPM, ILF3, IMP1, G3BP and RL8 as proteins that specifically co-purify with β -mRNA and, therefore, tentatively form part of the β -F1-RNP. Interestingly, *in vitro* assays showed that the recombinant G3BP, IMP1 and NPM specifically inhibited the translation of β -mRNA. Over-expression experiments showed that only G3BP was capable of specifically inhibit the synthesis of β -F1-ATPase, strongly supporting a direct role for this protein in the masking of β -mRNA in cancer. In addition, we have developed a cell line for the purification of β -mRNABPs that participate *in vivo* in translation repression of β -mRNA. In this system we have been able to visualize the sub-cellular localization of β -mRNA as well as to purify two additional β -mRNABPs of the cytoskeleton (α -actinin and vimentin) that might participate in sorting/localization of β -mRNA in the cell. Finally, we have generated a construct that, when over-expressed in mammalian cells, interferes with the activity of the mitochondrial H^+ -ATP sythase strongly suggesting its usefulness for the future development of animal models aimed to assess the relevance of the activity of the H^+ -ATP-synthase in cancer biology.

INTRODUCCIÓN

La mitocondria es un orgánulo de doble membrana presente en la mayoría de las células eucarióticas. La actividad de la mitocondria es esencial para la fisiología de la célula ya que es responsable de la producción de la mayor parte de la energía metabólica, de la transducción de señales mediadas por calcio (Satrustegui y cols., 2007) y especies reactivas de oxígeno (Brunelle y cols., 2005) y de la regulación y ejecución del programa de muerte celular (Wang, 2001). La mitocondria es un orgánulo dinámico y sus cambios morfológicos están generalmente asociados con su funcionalidad (Martinez-Diez y cols., 2006; Santamaria y cols., 2006; Benard y cols., 2007). Su composición molecular depende de la expresión coordinada de los genomas nuclear y mitocondrial (Garesse y Vallejo, 2001) y es específica de cada tipo celular (Mootha y cols., 2003; Reifschneider y cols., 2006) y de las condiciones fisiológicas o patológicas (Biswas y cols., 1999; Cuezva y cols., 2002; Kulawiec y cols., 2006). Dado que la mitocondria juega un papel fundamental en la homeostasis de la célula eucariótica, las alteraciones moleculares y/o funcionales de este orgánulo están frecuentemente asociadas con diversas patologías humanas, entre las que destacan las enfermedades neurodegenerativas (Ortega y Cuezva, 2004) y el cáncer (Ortega y Cuezva, 2005; Cuezva y cols., 2007).

1. El cáncer

El término cáncer hace referencia a un conjunto heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por la existencia de células anormales que proliferan de forma descontrolada y que pueden invadir otros tejidos. En la actualidad el cáncer es la primera causa de mortalidad en hombres y la segunda en mujeres. Sólo en España mueren casi 100.000 personas y se diagnostican unos 162.000 nuevos casos de media cada año (López-Abente, 2007). Hasta la fecha, se han descrito más de 100 tipos distintos de cáncer, que se clasifican de muchas formas aunque lo más frecuente es categorizar los tumores por el órgano o tejido en que se originan y por el tipo celular concreto implicado. En este sentido, se entiende por carcinoma el tumor que se origina en células epiteliales de un órgano determinado. Los carcinomas representan el 80% de los tumores y se pueden sub-clasificar como adenocarcinomas (glándulas), escamosos o epidermoides (células epiteliales no glandulares), basocelulares (capa de células epiteliales más profunda de la epidermis) y melanomas (melanocitos). Los tumores que no se originan en tejido epitelial son los sarcomas (células del tejido conectivo), las leucemias (línea mieloide o linfoide) y los linfomas (linfocitos, tumor sólido).

La etiología, desarrollo y terapia de cada tipo de cáncer es distinta. El adenocarcinoma de mama presenta una incidencia de 16.000 nuevos casos diagnosticados cada año en España y una mortalidad de 6.000. En la última década, la mortalidad ha experimentado un descenso medio de 1,4% anual debido, fundamentalmente, a la puesta en marcha de programas de cribado para la detección precoz y los avances en diagnóstico y terapia. Así, la supervivencia media relativa de una paciente a los 5 años ha llegado al 86%. El carcinoma de pulmón causa 19.000 muertes al año, siendo el cáncer que presenta la mayor mortalidad en España. Presenta una incidencia de 18.500 nuevos casos cada año y una prevalencia muy semejante, indicando el mal pronóstico de los pacientes, con una supervivencia relativa a los 5 años menor al 12%. El carcinoma basocelular de piel es el tumor que presenta mayor incidencia pero, dado que la probabilidad de metastatizar es muy baja, presenta una mortalidad muy reducida ya que la inmensa mayoría de los casos se cura por resección (López-Abente, 2007).

El diagnóstico de un tumor se realiza mediante el estudio anatómo-patológico de una biopsia del mismo y el uso de técnicas de imagen para la determinación de la afectación de ganglios linfáticos y la identificación de metástasis lejanas. Este tipo de análisis permite clasificar la enfermedad en un estadio concreto de progresión y con esta información, y teniendo en cuenta otras características del paciente como el sexo, la etnia o la población en la que reside, el oncólogo puede emitir un pronóstico y diseñar la terapia más adecuada para ese caso. No obstante, el uso de marcadores clínico-patológicos en carcinomas de mama (Singletary y cols., 2002) no permite la perfecta estratificación de los pacientes ni la identificación de determinados grupos con alto riesgo de recidiva. En este sentido, la implementación de biomarcadores moleculares que puedan complementar esta información diagnóstica puede resultar de gran utilidad en la clínica oncológica (Coradini y Daidone, 2004; Isidoro y cols., 2005). Por ejemplo, mutaciones germinales de BRCA1 y BRCA2 aumentan enormemente el riesgo de desarrollar carcinomas de mama, aunque la prevalencia de esta mutación es muy baja y está asociada a menos del 10% de los casos (Fackenthal y Olopade, 2007). Por otro lado, dado que la mortalidad en carcinomas de pulmón es muy elevada y que la etiología de la enfermedad está asociada al consumo de tabaco en el 80% de los casos (López-Abente, 2007), la única solución posible es el diagnóstico temprano de la enfermedad en grupos de riesgo, antes incluso a la aparición de los síntomas. Así, se han descrito hasta la fecha mutaciones en genes supresores de tumores en carcinomas de pulmón. Los más frecuentemente mutados son p53, p16 y LKB1 (Sanchez-Cespedes, 2003). Aunque la prevalencia de las alteraciones

en estos genes en cáncer de pulmón es más frecuente que la de los BRCA en los carcinomas de mama, no está claro que las mutaciones estén en la etiopatogenia de la enfermedad pudiéndose adquirir en fases más tardías del progreso de la enfermedad.

2. Metabolismo energético de las células tumorales

En un esfuerzo por recopilar la información disponible acerca de la investigación sobre las bases moleculares del cáncer de los últimos 15 años del siglo pasado, Hanahan y Weinberg propusieron las seis alteraciones que debe sufrir una célula normal para adquirir el fenotipo tumoral: autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a señales negativas de crecimiento, evasión de apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión de tejidos y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000). En ese trabajo seminal no se recogió la observación que Otto Warburg había realizado 50 años antes en la que indicaba que la alteración del metabolismo energético es un rasgo común de las células tumorales (Warburg, 1956a; 1956b). En estos seis últimos años, estamos asistiendo al redescubrimiento y aplicación de esta observación en la investigación y terapia del cáncer (Garber, 2006).

La glucosa es el sustrato energético preferencial de las células. Su metabolismo por la vía glucolítica es fuente de provisión de energía metabólica y, fundamentalmente, de los precursores necesarios para la homeostasis celular. Así, la glucosa circulante es captada por las células mediante sistemas de transporte específicos y, una vez en su interior, es oxidada en la glucolisis, dando lugar a dos moléculas de piruvato (Pyr) y equivalentes energéticos en forma de ATP y NADH (Fig. I1). En la mayoría de las células en aerobiosis, el Pyr entra en la mitocondria y se oxida en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), dando como resultado CO_2 y coenzimas reducidos (NADH y FADH_2) (Fig. I1). Éstos se re-oxidan mediante los complejos respiratorios de la membrana interna mitocondrial, que finalmente transfieren los electrones al O_2 molecular generando H_2O (Fig. I1). El transporte de electrones se lleva a cabo mediante una serie de reacciones REDOX acopladas que generan la suficiente energía para la translocación de H^+ por parte de los complejos I, III y IV desde la matriz mitocondrial al citosol. Este transporte genera el gradiente electroquímico de H^+ ($\Delta\mu\text{H}^+$), que es el intermediario metabólico para la síntesis de ATP mediante el complejo de la H^+ -ATP sintasa (Fig. I1). El proceso se denomina genéricamente fosforilación oxidativa (OXPHOS) y da lugar

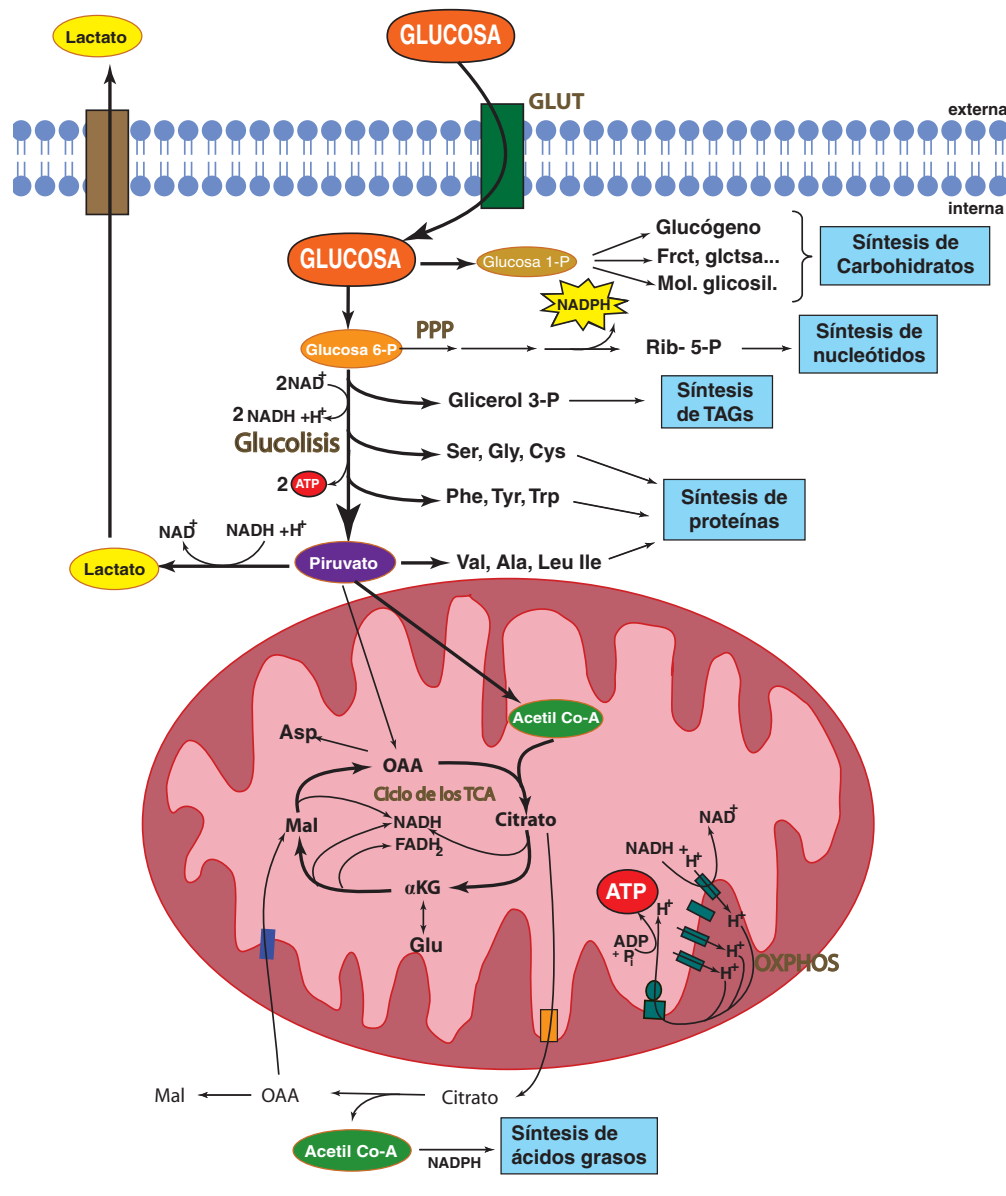


Figura I1: Metabolismo glucolítico y mitocondrial. La célula eucariótica cuenta con dos sistemas de producción de energía y de precursores biosintéticos que están espacialmente separados por la compartimentación de la mitocondria. La glucosa circulante es captada activamente por los transportadores de glucosa GLUT. Una vez en el citoplasma la glucosa se puede oxidar secuencialmente en la glucólisis dando lugar a 2 moléculas de piruvato (Pyr), NADH y ATP. Numerosos intermediarios de esta ruta son precursores de la biosíntesis de otras moléculas: azúcares, aminoácidos y poder reductor (NADPH). El Pyr puede entrar en la mitocondria y sufrir una descarboxilación oxidativa que da lugar a acetil-CoA, que se condensa con el oxalacetato (OAA) cebando así el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). El TCA genera coenzimas reducidos (NADH y FADH₂) que se re-oxidan mediante los complejos respiratorios, que transfieren los e⁻ hasta el O₂ permitiendo el bombeo H⁺ en contra de gradiente. Se genera así el gradiente electroquímico para la síntesis de ATP mediante la fosforilación oxidativa (OXPHOS). El TCA se puede rellenar también con aminoácidos (Asp, Glu). La célula tumoral puede presentar una demanda de precursores biosintéticos aumentada de manera que incrementa el flujo glucolítico y necesita re-oxidar el NADH generado rápidamente a través de la fermentación del Pyr a lactato. Un ejemplo de alteración mitocondrial que está ligada a las necesidades biosintética de la célula tumoral es la interrupción del TCA para la síntesis de ácidos grasos en el citoplasma.

a un rendimiento energético 20 veces mayor que la oxidación de la glucosa por vía glucolítica. En efecto, en determinadas situaciones fisiológicas, como es la hipoxia, o cuando existen alteraciones genéticas o epigenéticas que conllevan una disfunción bioenergética de la mitocondria (Ortega y Cuezva, 2005), el NADH generado durante la glucólisis tiene que re-oxidarse mediante la reducción del Pyr a lactato en el citosol y así la vía puede continuar metabolizando glucosa (Fig. I1). El balance energético de esta vía es mucho menor que el que se obtiene a través de la OXPHOS, por lo que para hacer frente a la demanda energética las células incrementan la velocidad de captación y consumo de glucosa.

Sin embargo, es un error muy extendido considerar a la glucólisis aeróbica como una vía destinada exclusivamente a la provisión de energía metabólica. De hecho, tanto la glucólisis como el TCA son rutas anfibólicas: es decir, que sus intermediarios participan como precursores biosintéticos de otras vías metabólicas necesarias para la homeostasis de la célula. Así, el oxalacetato (OAA) y el α -cetoglutarato del TCA son precursores del aspartato y el glutamato, respectivamente (Fig. I1), siendo éstos además precursores de otros aminoácidos y nucleótidos. El succinil-CoA es el precursor para la síntesis de porfirinas y del grupo hemo, mientras que el citrato genera el acetil-CoA citosólico para la biosíntesis de lípidos (Fig. I1). A su vez, otras rutas anapleróticas pueden *rellenar* el TCA dependiendo de las necesidades de la célula. Así el Pyr puede generar OAA y la glutamina el α -cetoglutarato (Fig. I1). Por otro lado, los intermediarios glucolíticos se re-dirigen para la biosíntesis de lípidos, nucleótidos, proteínas y otros carbohidratos (Fig. I1). Así, la glucosa es precursor de la síntesis de glucógeno, otros monosacáridos y de moléculas glicosiladas. Es de destacar que la glucosa-6-fosfato produce ribosa-5-fosfato como precursor de ácidos nucleicos por la vía de las pentosas fosfato (PPP, Fig. I1). Esta vía produce además el NADPH necesario para muchos procesos biosintéticos (eg, síntesis de ácidos grasos) y la destoxificación de radicales libres. Además, la dihidroxiacetona fosfato da lugar al glicerol-3-fosfato, necesario para la síntesis de triacilgliceroles (Fig. I1) y muchos aminoácidos derivan de los intermediarios glucolíticos fosfoenolpiruvato, 3-fosfoglicerato y del mismo Pyr (Fig. I1).

El perfil metabólico de las células tumorales y las normales de las que proceden no puede ser el mismo ya que el metabolismo intermediario ha de proveer a la célula tumoral que se está dividiendo de forma descontrolada de la energía y los sustratos biosintéticos requeridos para la proliferación celular. Cada tipo celular presenta un fenotipo metabólico distinto (Acebo y cols., 2008). Las células

diferenciadas tienen, en general, una dependencia elevada de la OXPHOS como principal vía de producción de ATP. Warburg reveló que las células tumorales muestran una elevada tasa de captación de glucosa y un metabolismo glucolítico muy elevado en presencia de niveles fisiológicos de O_2 , lo que le llevó a sugerir que esta característica metabólica era un evento importante de la carcinogénesis (Warburg, 1956a; 1956b). La construcción de una célula hija requiere una activa biosíntesis de macromoléculas lo que, en último término, equivale a decir precursores metabólicos y energía. Ya que estos precursores deben ser *retirados* de la vía glucolítica, y que esta vía tiene un bajo rendimiento en producción de ATP, la célula tumoral compensa estas deficiencias incrementando la tasa de captación y consumo de glucosa por vía glucolítica (Lopez-Rios y cols., 2007).

2.1. Avidez por glucosa de la célula tumoral

Los primeros estudios sobre la captación de glucosa y la producción de lactato en tumores humanos *in vivo* se llevaron a cabo en tumores humanos implantados en animales (Gullino y cols., 1967). Las medidas de consumo de glucosa y de producción de lactato por el tumor se estimaban por la diferencia en el contenido de ambos analitos entre la circulación entrante y saliente del mismo. Estudios en tumores de rata y en tumores humanos transplantados revelaron la existencia de una elevada tasa de consumo de glucosa directamente relacionada con la producción de lactato y dependiente de la cantidad de glucosa disponible (Gullino y cols., 1967; Sauer y cols., 1982; Kallinowski y cols., 1988). Más recientemente, los flujos de sustratos energéticos se han realizado a través de carcinomas de colon de pacientes durante la intervención quirúrgica. La comparación respecto a la captación neta de glucosa y la producción de lactato en tejidos periféricos muestra un incremento de 30 y 43 veces, respectivamente (Holm y cols., 1995). Asimismo, se han realizado medidas de la actividad enzimática en carcinomas renales observando una activación de la vía glucolítica y una reducción de la gluconeogénica (Steinberg y cols., 1992). El aumento en la actividad es coherente con la inducción que presentan enzimas glucolíticas relevantes en muchos de estos tumores (Cuezva y cols., 2002; Isidoro y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005).

En los últimos años, se ha popularizado el uso de técnicas proteómicas para la identificación de marcadores proteicos del cáncer y, gracias a esta tecnología, se han definido perfiles proteicos característicos (o firmas del cáncer) de determinados tipos de tumores. Estos estudios han demostrado que la expresión elevada de

enzimas glucolíticas puede representar una huella de la célula cancerosa (Cuezva y cols., 2002; Isidoro y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005; Bi y cols., 2006). En esta línea, en un meta-análisis desarrollado para la identificación de una firma común del cáncer independiente del tipo tumoral, se han recopilado los resultados de microarrays de 39 estudios distintos que implican globalmente 634 muestras de tejido normal y 1.552 muestras correspondientes a 20 tipos de tumores distintos. Coherentemente, el análisis integrado de la expresión muestra que muchos de los genes de la vía glucolítica están aumentados en la mayor parte de los tumores (Lu y cols., 2007).

En el ámbito de la clínica oncológica, se está usando una técnica no invasiva de imagen, la tomografía de emisión de positrones empleando 2-[¹⁸F]-2-desoxi-D-glucosa como trazador (FDG-PET), para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con distintos tipos de carcinomas (Rigo y cols., 1996; Vansteenkiste y cols., 2004). El procedimiento comienza con la inyección del análogo FDG no metabolizable en el torrente circulatorio que se deja incorporar a los tejidos durante un periodo de tiempo (habitualmente, en torno a 45 min). La técnica se basa en que la sonda incorporada en las células decae emitiendo positrones, y la radiación gamma resultante es detectada por el tomógrafo, que genera una imagen que refleja la cantidad de glucosa captada por los tejidos. En los escaners es posible valorar de forma semi-cuantitativa la captación de glucosa en una área determinada corregida por la actividad específica de la sonda con un parámetro que se denomina SUV (Standardized Uptake Value) (Vansteenkiste y cols., 2004). Mediante esta tecnología se ha demostrado la elevada tasa de captación de glucosa de tumores humanos y, más aun, que la SUV es un marcador independiente para el pronóstico de carcinomas de pulmón y mama, linfomas, gliomas y sarcomas (Sasaki y cols., 2005; Lopez-Rios y cols., 2007; Mankoff y cols., 2007).

2.2. Bases moleculares del fenotipo glucolítico de la célula tumoral

2.2.1 Oncogenes e hipoxia

Aunque la elevada tasa de captación de glucosa de la célula tumoral se ha demostrado a niveles funcional, bioquímico y molecular, se desconoce el mecanismo molecular responsable de este fenotipo. Una gran parte de los estudios recientes en este sentido proponen la implicación de la hipoxia así como de oncogenes y genes supresores de tumores en la inducción de las enzimas de la vía glucolítica.

Introducción

Se ha propuesto que el ambiente hipóxico en el que, en ocasiones, se desarrolla un tumor, promueve la estabilización del factor inducible por hipoxia HIF1 α que, a su vez, induce directamente la transcripción de enzimas glucolíticas como la aldolasa, la fosfoglicerato quinasa, la fosfofructoquinasa, la PK, LDHA y GLUT1 (Fig. I2) (Semenza y cols., 1994; Ebert y cols., 1995).

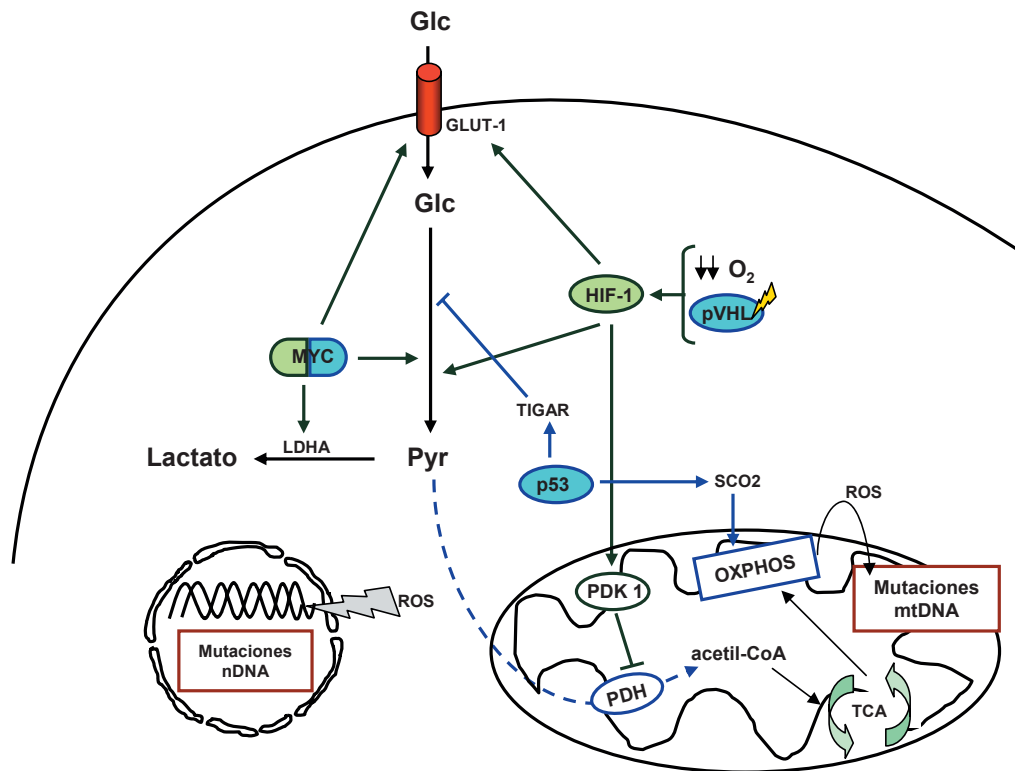


Figura I2 El efecto Warburg en cáncer. El entorno hipóxico del tumor induce la activación de HIF1 α que favorece el transporte de glucosa, transactiva genes glucolíticos y activa directamente el gen PDK1, el cual inhibe a PDH que cataliza la conversión de piruvato a acetil-CoA. El acetil-CoA entra en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) que dona electrones a la cadena respiratoria. La inhibición de PDH por PDK1 atenúa la función mitocondrial, resultando en un aumento de la transformación del piruvato a lactato. El aumento de la glucólisis en tumores puede ocurrir incluso en presencia de O₂ mediante la activación de HIF1 α por oncogenes. El oncogén myc puede favorecer la glucólisis mediante la inducción de genes glucolíticos y de la biogénesis mitocondrial. HIF1 α media la activación de MYC-1, que inhibe la actividad transcripcional de *c-myc*, resultando en una inhibición de la biogénesis de la mitocondria. En este sentido, niveles altos de *c-myc* podrían favorecer la producción de ROS que pueden causar mutaciones en el mtDNA y nDNA, favoreciendo así la disfunción de la mitocondria. La pérdida de función de genes supresores de tumores también favorece la glucólisis aeróbica: (i) La inactivación de pVHL permite la estabilización de HIF1 α y (ii) la inactivación de p53 favorece la glucólisis al no inducirse el inhibidor TIGAR y ni el factor que controla el ensamblaje del complejo IV SCO2.

La activación y pérdida de función de proto-oncogenes y genes supresores de tumores, respectivamente, pueden llevar asociados cambios en el metabolismo que han sido considerados como efectos secundarios de la alteración génica (Dang y Semenza, 1999; Kim y Dang, 2006). *c-myc* es un regulador transcripcional

positivo de numerosas enzimas glucolíticas como lactato deshidrogenasa (LDHA) y el transportador de glucosa GLUT1 y se ha descrito que es capaz de inducir la captación de glucosa así como la producción de lactato en células (Fig. I2) (Shim y cols., 1997; Osthus y cols., 2000). Además, LDHA está sobre-expresada en distintos tumores y es esencial para la transformación mediada por *c-myc* (Shim y cols., 1997; Fantin y cols., 2006). Sin embargo, y aunque resulte paradójico, la activación de MYC en un modelo de células B promueve la respiración y la biogénesis mitocondrial (Li y cols., 2005).

Se conocen diferentes vías de estabilización de HIF1 α en situaciones no hipóxicas mediadas por señalización oncogénica (Kim y Dang, 2006). Además, líneas celulares de carcinoma de mama metastático muestran un consumo mayor de glucosa que otras líneas no metastáticos y niveles elevados de HIF1 α (Robey y cols., 2005). En células de carcinoma renal que presentan la pérdida de función pVHL (que promueve la degradación de HIF1 α), la glucolisis aerobia puede ser revertida al restaurar la función de este gen supresor de tumores (Robey y cols., 2005) (Fig. I2). Recientemente, se ha propuesto que HIF1 α y *c-myc* colaboran en la promoción del fenotipo glucolítico cuando existe una sobre-expresión de *c-myc* mediante la inducción cooperativa de la Pyr deshidrogenasa quinasa (PDK1), la hexoquinasa II y LDHA (Dang y cols., 2008).

El oncogén *akt* regula la proliferación, la supervivencia celular (Lawlor y Alessi, 2001) y promueve un fenotipo glucolítico que es esencial para la supervivencia celular en ausencia de factores de crecimiento mediada por *akt* (Rathmell y cols., 2003). Además, *akt* promueve una estimulación de la glucolisis de forma dosis-dependiente, demostrándose además que la glucolisis aerobia correlaciona con la agresividad del tumor *in vivo* (Elstrom y cols., 2004). En este sentido, la sobre-expresión de *akt* en melanomas de crecimiento radial no invasivos induce la expresión de marcadores glucolíticos, estimula el consumo de glucosa por parte del tumor y promueve su transformación en un melanoma invasivo de crecimiento vertical (Govindarajan y cols., 2007).

El gen supresor de tumores p53 también ha sido relacionado con el cambio glucolítico de la célula cancerosa. Por un lado, se ha descrito que la sobre-expresión de una versión dominante negativa de p53 en algunos tumores promueve la inducción de hexoquinasa II y un incremento del consumo de glucosa *in vivo* (Mathupala y

cols., 1997; Smith y cols., 2006). Por el otro, recientemente se ha mostrado que un nuevo inhibidor celular de la fructosa bis-fosfatasa llamado TIGAR es una diana transcripcional para p53. En este sentido, la pérdida de función de p53 mantendría reprimida la expresión de esta proteína, explicando así su asociación con una glucólisis aumentada (Fig. I2) (Bensaad y cols., 2006).

Aunque la implicación de los oncogenes/genes supresores de tumores en la promoción del metabolismo glucolítico en las células cancerosas puede ser molecularmente plausible, la frecuencia de las mutaciones en estos genes no suele superar el 50% de los casos (Garber, 2006), mientras que el incremento en la tasa de captación y consumo de glucosa asociado a la tumorigénesis es una condición generalizada (Cuezva y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005). Esto significa que la alteración de la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores no puede ser la única base molecular que explique el desarrollo y mantenimiento del fenotipo glucolítico aberrante de las células cancerosas.

2.2.2. Alteraciones de la función mitocondrial

Otto Warburg sugirió que el fenotipo glucolítico aumentado que se observa en las células tumorales es consecuencia de un daño irreversible de la función mitocondrial (Warburg, 1956b). Según esta hipótesis, aquellas células que sufren un daño mitocondrial irreversible en la respiración y consiguen evadir la muerte, son capaces de transmitir el fenotipo de forma que éste queda perpetuado (Warburg, 1956b). Si bien la formulación de O. Warburg es muy radical, al haberla circunscrito a un defecto en la respiración (sin mencionar explícitamente la fosforilación oxidativa), su hipótesis está basada en el principio de regulación metabólica que conocemos como efecto Pasteur. Así, en la terminología de hoy día, el efecto Pasteur se refiere a que el flujo glucolítico de una célula está controlado por producción de energía en forma de ATP mediante la OXPHOS. Por lo tanto, la hipótesis de Warburg no es sino una extensión del efecto Pasteur ya que, si existe una alteración funcional de la mitocondria que pueda comprometer la provisión de energía celular (hipoxia, daño genético, etc), la célula responde induciendo la vía glucolítica. Sorprendentemente, la hipótesis de Warburg ha sido rechazada o considerada como un epifenómeno de la transformación celular, fundamentalmente, como consecuencia del desarrollo biología molecular y del auge de la genética del cáncer en el último tercio del siglo XX.

En cualquier caso, desde que la OXPHOS se atribuyó a la mitocondria se han realizado numerosos estudios encaminados al establecimiento de las alteraciones metabólicas y moleculares de la mitocondria de la célula tumoral (ver excelente revisión (Pedersen, 1978)). En este sentido, se ha descrito que en condiciones hipóxicas se produce una descarboxilación aberrante del Pyr a acetaldehído que lleva a la inactivación de la Pyr deshidrogenasa (PDH), cuello de botella en la oxidación de Pyr por vía mitocondrial (Baggetto, 1992). Asimismo, se ha descrito que la glutamina puede cebar el TCA (Fig. I1) (DeBerardinis y cols., 2007) que en la célula tumoral puede estar truncado al nivel del citrato, probablemente debido a una actividad reducida de la aconitasa (Parlo y Coleman, 1984). El citrato acumulado se transporta rápidamente al citosol (Parlo y Coleman, 1984) donde genera acetil-CoA y OAA por acción de la ATP-citrato liasa (ACL) (Hatzivassiliou y cols., 2005). El acetil-CoA citosólico es el sustrato para la síntesis de ácidos grasos y el OAA vuelve a la mitocondria por la acción concertada de la malato deshidrogenasa y el transportador α -cetoglutarato-malato (Fig. I1) (Satrustegui y cols., 2007). Se han descrito numerosas deficiencias en enzimas del sistema OXPHOS en cáncer, entre las que destacan las que afectan a la H^+ -ATP-sintasa (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2007; Capuano y cols., 1996) y a la sobre-expresión de su inhibidor fisiológico IF1 (Luciakova y Kuzela, 1984; Bravo y cols., 2004). Coherentemente, las mitocondrias de las células de tumores que crecen rápidamente muestran un menor número de crestas y son más pequeñas que las del tejido normal (Pedersen, 1978). En algunos tumores, se ha descrito además una reducción significativa del número de mitocondrias por célula (Pedersen, 1978; Cuezva y cols., 2002). Más recientemente, numerosos grupos de investigación han secuenciado exhaustivamente el genoma mitocondrial en distintos tipos de tumores demostrando la alta frecuencia de mutaciones somáticas del mt-DNA en carcinomas de mama (Parrella y cols., 2001; Tan y cols., 2002) y otros tumores (Carew y Huang, 2002). Por otro lado, mutaciones en genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales pueden causar predisposición para desarrollar ciertos tipos de neoplasias hereditarias (Eng y cols., 2003). Finalmente, hay que destacar que la eliminación específica de la proteína mitocondrial frataxina en el hígado promueve el desarrollo de adenomas hepáticos en un modelo animal (Thierbach y cols., 2005), mientras que la sobre-expresión de frataxina en células tumorales de colon induce el metabolismo oxidativo y disminuye la proliferación celular (Schulz y cols., 2006).

La disfunción mitocondrial de la célula tumoral también se ha asociado con oncogenes y genes supresores de tumores. Así, p53 regula directamente el

consumo de oxígeno mediante el control de la actividad de la citocromo oxidasa (Zhou y cols., 2003), probablemente a través de la inducción de SCO2, una proteína que controla el ensamblaje del complejo IV (Fig. I2) (Matoba y cols., 2006). HIF1 α puede activar a la PDK1, que inhibe a la PDH y previene la descarboxilación oxidativa del Pyr en la mitocondria y, por tanto, el cebado del TCA (Fig. I2) (Kim y Dang, 2006). HIF1 α puede inhibir la biogénesis de la mitocondria mediante la inducción de MXI-1, un represor de la actividad transcripcional mediada por c-myc (Dang y cols., 2008), mientras que pVHL promueve la biogénesis y actividad mitocondrial (Hervouet y cols., 2005).

2.2.3. El fenotipo metabólico de la célula proliferante

Independientemente de las alteraciones genéticas que adquiere la célula durante el proceso de transformación, no se puede descartar la posibilidad de que el fenotipo glucolítico que se observa en la mayor parte de los tumores humanos corresponda en realidad al fenotipo metabólico de la célula proliferativa (Lopez-Rios y cols., 2007). Se ha descrito que cuando se estimula la proliferación de linfocitos mediante concavalina A se incrementa la glucólisis aerobia, y que cuando vuelven al estado quiescente disminuye la producción de lactato (Wang y cols., 1976). Además, las levaduras cultivadas sin un exceso de glucosa presentan un ciclo de replicación sincrónico unido a un consumo de O₂ oscilante, alternando de esta forma una fase reductiva y una oxidativa (Klevecz y cols., 2004). Este ciclo metabólico viene definido además por la expresión periódica del 50% del transcriptoma (Tu y cols., 2005), de tal manera que se produce la expresión de 3 *super-clusters* de genes que coinciden con las fases del ciclo (Klevecz y cols., 2004). Así, se han definido las fases reductiva constructiva, reductiva de carga y oxidativa del ciclo metabólico por la existencia de un patrón de expresión génica (Reinke y Gatfield, 2006) y de acumulación de metabolitos (Tu y cols., 2007) característicos de cada fase. En este sentido, la síntesis de los componentes moleculares de la mitocondria ocurre preferencialmente durante la fase reductiva constructiva en levaduras (Tu y cols., 2005) y en las fases S, G2 y M del ciclo celular en células de mamífero (Martinez-Diez y cols., 2006).

Durante su replicación el DNA queda desprotegido volviéndose particularmente vulnerable a agresiones genotóxicas. La función mitocondrial constituye una fuente natural de producción de especies reactivas de O₂ (ROS) por lo que el fenotipo glucolítico de la célula proliferativa puede contribuir a minimizar el daño

oxidativo. Por ello, no es de extrañar que la replicación de los genomas nuclear y mitocondrial se lleve a cabo de forma simultánea (Martínez-Díez y cols., 2006). De hecho, se ha descrito que la producción de ROS en timocitos quiescentes se reduce al mínimo cuando son activados y proliferan (Brand y Hermfisse, 1997). Además, los mutantes de levadura del ciclo metabólico presentan una elevada tasa de mutagénesis espontánea (Chen y cols., 2007). De forma coherente, se ha descrito en dos trabajos recientes que la ciclina D1 puede inhibir la función mitocondrial (Sakamaki y cols., 2006) y que este control podría estar ejercido a través de la fosforilación e inactivación del factor de transcripción NRF1 (Nuclear respiratory factor 1) por el complejo CDK-ciclina D1 (Wang y cols., 2006).

3. Metabolismo energético y biogénesis mitocondrial

Un ejemplo del efecto Pasteur en células de mamífero es el cambio que se produce en la relevancia de la ruta de obtención de energía que se produce en hepatocitos de rata en el momento del nacimiento (Cuezva y cols., 1997; Cuezva y cols., 2007). Durante la etapa fetal del desarrollo del hígado de rata, las células obtienen fundamentalmente su energía metabólica mediante la glucólisis, produciendo grandes cantidades de lactato (Mayor y Cuezva, 1985) (Fig. I3A). Poco después del nacimiento, se produce una disminución brusca de la tasa de consumo de glucosa con un aumento paralelo del consumo de oxígeno (Cuezva y cols., 1997; Cuezva y cols., 2007) (Fig. I3A). La reducción de la producción de lactato por parte de los hepatocitos neonatales (efecto Pasteur) está provocada por el comienzo de la función mitocondrial (Valcarce y cols., 1988; Valcarce y cols., 1990). En este corto periodo de tiempo, las mitocondrias fetales, desacopladas e inhábiles para la producción eficiente de ATP, presentan un incremento de su potencial de membrana y de la producción de ATP por medio de la OXPHOS (Valcarce y cols., 1988). Estos cambios metabólicos están reflejados en la diferente preponderancia de la expresión de enzimas de la glucólisis y de la fosforilación oxidativa entre los hepatocitos fetales y neonatales (Fig. I3B).

El establecimiento de la función mitocondrial tras el nacimiento es un proceso activo de biogénesis que requiere la expresión coordinada de los genomas nuclear y mitocondrial (Valcarce y cols., 1988; Luis y cols., 1993; Izquierdo y cols., 1990; Izquierdo y cols., 1995). A diferencia de otros procesos inducidos en la misma etapa del desarrollo, la regulación de la expresión de estos dos genomas está controlada a nivel post-transcripcional (Luis y cols., 1993; Izquierdo y cols., 1990; Izquierdo y

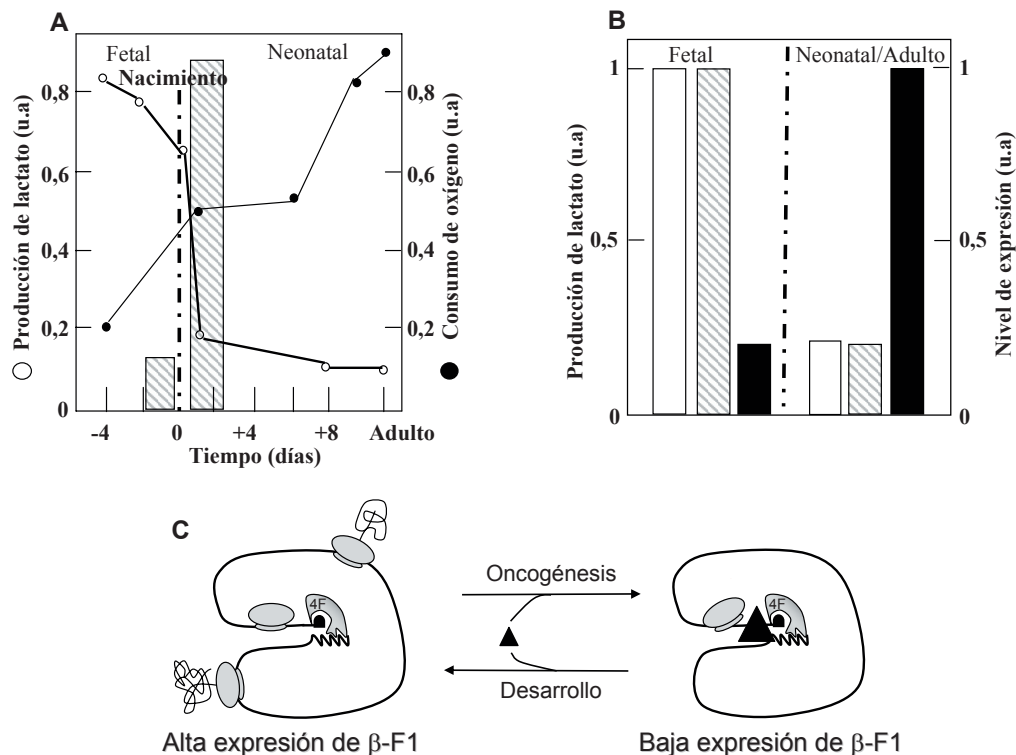


Figura 13: El efecto Pasteur durante el desarrollo del hígado de rata. **A**, El nacimiento (línea discontinua) promueve un incremento (10 veces) de la concentración de O_2 en la sangre (barras rayadas) de la rata recién nacida. La tasa de glucólisis aerobia (círculos blancos) disminuye de forma acentuada tras el nacimiento como resultados de un fenómeno de biogénesis mitocondrial en el hepatocito del neonato. La tasa de consumo de O_2 del hepatocito durante el desarrollo está indicada (círculos negros). **B**, La tasa de producción de lactato (barras blancas) y los niveles de expresión de enzimas glucolíticas (barras rayadas) y de la proteína β -F1-ATPasa por unidad de hígado cambian enormemente durante el desarrollo. **C**, Modelo de la represión de la expresión de β -F1-ATPasa durante la etapa fetal y en oncogénesis. El mRNA de β -F1-ATPasa (línea negra) presenta dos estados de eficiencia traduccional. Éstos están relacionados con la baja (célula fetal y hepatoma) y la alta expresión (neonato y adulto) de la proteína. La unión de proteínas específicas presentes en el hígado fetal y en el tumoral (β -mRNABPs, triángulo negro) a la región 3'UTR del mRNA impide la iniciación eficiente de la traducción. La traducción del mRNA de β -F1-ATPasa se representa sobre una molécula circular debido a la interacción física promovida por el factor eIF4F. Asimismo, se representan los ribosomas y el polipéptido nascente.

cols., 1995; Ostronoff y cols., 1995; Ostronoff y cols., 1996). En concreto, los mRNAs que codifican subunidades del sistema OXPHOS se acumulan en el hígado fetal como resultado de cambios en su estabilidad (Izquierdo y cols., 1995; Ostronoff y cols., 1995). Durante esta etapa los mRNAs se encuentran traduccionalmente enmascarados. En el momento del nacimiento, sin embargo, estos mRNAs se convierten en sustratos preferenciales para la maquinaria de traducción (Luis y cols., 1993; Ostronoff y cols., 1996). En el caso concreto del mRNA de la subunidad catalítica del complejo H^+ -ATP-sintasa (β -mRNA) sabemos que el control post-

transcripcional de su expresión es muy relevante en el desarrollo (Izquierdo y cols., 1990; Luis y cols., 1993; Izquierdo y cols., 1995; Izquierdo y Cuezva, 1997), durante el ciclo celular (Martínez-Díez y cols., 2006) y en células tumorales (de Heredia y cols., 2000). De hecho, se ha comprobado *in vitro* e *in vivo* el incremento de la eficiencia traduccional del mRNA en el hígado neonatal (Luis y cols., 1993).

El control de la traducción está ejercido por proteínas que se unen a la región 3' no traducible (3'UTR) del mensajero de β -F1-ATPasa (β -mRNABPs) (Izquierdo y Cuezva, 1997; Ricart y cols., 2002; Izquierdo y Cuezva, 2005) (Fig. I3C). El 3'UTR de β -mRNA es esencial ya que funciona como una secuencia intensificadora de la traducción *in vitro* (Izquierdo y Cuezva, 1997) e *in vivo* (Di Liegro y cols., 2000). La unión de las proteínas a β -mRNA es específica de tejido (Izquierdo y Cuezva, 1997) y puede estar relacionada con la distinta eficiencia traduccional que muestra este mensajero en distintos tejidos de rata (Izquierdo y Cuezva, 1993). Hemos propuesto que la actividad inhibidora de las β -mRNABPs se puede llevar a cabo mediante el impedimento estérico para el anclaje de la maquinaria traduccional en el mRNA circularizado (Fig. I3C). En este sentido, el 3'UTR presenta una actividad funcional de iniciación interna de la traducción, semejante a la de las secuencias IRES (Izquierdo y Cuezva, 2000), que podría jugar un papel muy relevante en la traducción específica de β -mRNA durante la fase G2/M del ciclo celular (Martínez-Díez y cols., 2006), aunque en la actualidad estos conceptos están siendo todavía objeto de una intensa discusión (Schneider y cols., 2001; Kozak, 2007).

El mRNA de β -F1-ATPasa se agrupa formando estructuras de gran tamaño, que se pueden observar en el núcleo, citoplasma y asociadas a la membrana externa de la mitocondria (Egea y cols., 1997) y que, además, pueden estar relacionadas con la traducción localizada de β -mRNA (Egea y cols., 1997; Ricart y cols., 1997). La localización preferencial de β -mRNA en estas estructuras depende del 3'UTR y de una secuencia del ORF que también puede unir proteínas (Ricart y cols., 2002). Por lo tanto, las proteínas de unión a β -mRNA están implicadas en el control de la traducción (Izquierdo y Cuezva, 1997), la localización (Ricart y cols., 2002) y, presumiblemente, la estabilidad del RNA durante el desarrollo del hígado de rata (Izquierdo y cols., 1995) y en oncogénesis (de Heredia y cols., 2000). A pesar de la relevancia que las β -mRNABPs pueden tener para explicar la función mitocondrial, su naturaleza molecular no se conoce todavía.

El estudio del fenotipo bioenergético revela una gran semejanza entre la célula fetal y la tumoral. Otto Warburg, reflexionando sobre el origen de las células tumorales, afirma: “La fermentación de determinadas células del cuerpo es la herencia de ancestros des-diferenciados que vivían en el pasado a expensas de la energía obtenida de la fermentación” (Warburg, 1956b). Esto sugiere que durante la carcinogénesis puede estar produciéndose un fenómeno de des-diferenciación que, en términos energéticos podría denominarse reprogramación metabólica. En este sentido, el modelo del desarrollo embrionario nos sirve como punto de partida para el estudio de la disfunción mitocondrial en cáncer y en particular para definir los objetivos de esta tesis.

OBJETIVOS

La mitocondria desempeña funciones esenciales para la fisiología de la célula. De hecho, alteraciones moleculares y funcionales del orgánulo están asociadas con diversas patologías, incluido el cáncer. En este sentido, en los últimos años se ha incrementado notablemente el interés científico en este campo debido, fundamentalmente, a tres hechos: (i) la verificación de que el proteoma bioenergético de la célula tumoral es muy distinto al de la célula normal, (ii) la constatación de que las funciones bioenergética y reguladora de muerte de la mitocondria están molecular y funcionalmente integradas y (iii) la implementación de técnicas de imagen por tomografía de emisión de positrones para el diagnóstico y seguimiento de pacientes oncológicos. Esta técnica ha permitido evaluar la tasa de consumo de glucosa por los tejidos y, por tanto, confirmar que los tumores tienen un fenotipo glucolítico en condiciones de aerobiosis.

Con estas premisas, en esta tesis nos hemos propuesto profundizar en la comprensión de este fenotipo aberrante planteándonos los siguientes objetivos:

1. Análisis y caracterización de la *huella bioenergética* en carcinomas de piel y de pulmón y de su posible utilidad para el diagnóstico y pronóstico de pacientes.
2. Contribuir a la caracterización de las bases moleculares que promueven la regulación post-transcripcional del mensajero de β -F1-ATPasa por su implicación en la huella bioenergética del cáncer.
 - 2.1. Desarrollo de una metodología que permite la purificación e identificación de las proteínas que interaccionan con el mRNA de β -F1-ATPasa.
 - 2.2. Identificación y caracterización molecular y funcional de las proteínas que se unen al mRNA de β -F1-ATPasa, así como de su posible relevancia en cáncer.
 - 2.3. Generación de modelos celulares de interferencia de la función de la mitocondria para el estudio molecular de la huella bioenergética.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material

1.1. Muestras humanas

Todas las muestras humanas utilizadas en este trabajo han sido recibidas codificadas con objeto de preservar la confidencialidad de los pacientes. Los estudios que se han realizado han sido aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Madrid, del IDIBAPS (Instituto de Investigaciones Biomédicas Augusto Pi y Suñer), Hospital Clinic de Barcelona, del Hospital Universitario Doce de Octubre y del Hospital Universitario de La Paz.

Las muestras de adenocarcinoma (LAC) y carcinoma escamoso de pulmón (SLC) y de tejido normal del mismo paciente consistían en secciones de 20 μ m de espesor de biopsias congeladas (-80°C) de pacientes no tratados del Banco de Tejidos y Tumores del IDIBAPS. Las secciones de tejido normal y tumoral de cada paciente fueron previamente analizadas por un patólogo.

Las muestras de carcinoma basocelular de piel (BCC) consistían en piezas congeladas (-80°C) de entre 15 y 100 mg de tejido procedentes de especímenes quirúrgicos de resecciones de carcinoma basocelular y de piel sana del mismo paciente. Las muestras de tejido nos las proporcionó el Dr. Manuel Navarro, del CIEMAT.

La inmunohistoquímica de muestras de LAC y SLC se realizó por el grupo del Dr. Fernando López-Ríos en el Hospital Universitario 12 de Octubre. Éste nos proporcionó los datos clínicos, de SUV, y de expresión de los marcadores. En la Tabla A1 en el anexo I se resumen las características clínicas y de SUV_{máx} de la cohorte de pacientes cuyas muestras hemos analizado.

Las muestras de adenocarcinoma de mama consistían en secciones de tejido congelado de especímenes quirúrgicos de 89 pacientes que fueron operados de adenocarcinoma de mama en el Hospital Universitario de La Paz entre los años 1991 y 2000. Se han excluido del estudio aquellos pacientes que recibieron quimioterapia antes de la operación. En la Tabla A2 en el anexo I se resumen las características clínicas de la cohorte de pacientes cuyas muestras hemos

analizado, así como los niveles de expresión de HuR en cada grupo clínico. Para más información consultar (Isidoro y cols., 2005).

1.2. Líneas celulares

- **HEK 293** (ATCC CRL-1573), derivada células transformadas con adenovirus 5 de riñón embrionario humano.
- **HepG2** (ATCC HB-8065), derivadas de carcinoma hepatocelular humano.
- **NRK** (ATCC CRL-6509), derivada a partir de células de riñón normal de rata.

1.3. Animales de experimentación

Se emplearon ratas albinas de raza Wistar de peso comprendido entre 200 y 300 g. Los animales fueron criados en el animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” en celdas estancas dotadas de ventilación y ciclos de luz/oscuridad. Los animales tuvieron en todo momento libre acceso al agua y a la dieta estándar del laboratorio (23% proteínas, 5% lípidos, 40,8% glúcidos, 4% celulosa, 5,7% sales minerales, 12% agua y vitaminas). La humedad osciló entre el 40-50% y la temperatura entre 22-24°C.

Los fetos a término ($5,2 \pm 0,1$ g) se obtuvieron por cesárea, previo sacrificio de la gestante de 22 días por dislocación cervical. Se diseccionó el útero completo, extrayendo de éste los fetos con sus respectivas placentas.

1.4. Cepas bacterianas

Para la clonación, mantenimiento y amplificación de plásmidos se han empleado las cepas bacteriana DH5 α y XL-Blue de *E. coli*. El cultivo de estas cepas se efectuó en medio Luria-Bertani (LB) (1% (p/v) bactotripton, 0,5% (p/v) extracto de levadura y 1% (p/v) NaCl) suplementado con ampicilina o kanamicina (100 μ g/ml), dependiendo de la resistencia del plásmido que portan.

Para la expresión de proteínas recombinantes en sistema procariótico se han empleado las cepas BL21, M15 y Rosetta de *E. coli*. El cultivo previo a la inducción con IPTG de estas cepas se efectuó en medio Luria-Bertani (LB) (1%

(p/v) bactotripton, 0,5% (p/v) extracto de levadura y 1% (p/v) NaCl) suplementado con glucosa 10 mM y ampicilina (100 µg/ml), o en el caso de M15 pREP4, con ampicilina y kanamicina (100 µg/ml cada uno). El cultivo de estas cepas con medio auto-inducible se detalla en el punto 2.1.5.

1.5. Plásmidos

- **pGEM T** (Promega, Madison, WI, EE.UU.): Hsp60, GAPDH para la producción de sondas. Vector para el clonaje directo de productos de PCR con A protuberante en los extremos. PK para expresión en sistema eucariota.
- **pBS-SK(+)** (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.): hβ-F1 para la producción de sondas. 3'UTR de hβ (hUTR) para la producción de sondas. Construcciones para la síntesis de RNAs híbridos: hβ-RNA-MS2, hβ3-MS2 y hUTR-MS2.
- **pMAL-C** (New England Biolabs, Beverly, MA, EE.UU.): MBP-CP e His-MBP-CP.
- **pCR 2.1** (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.): 3 MS2h
- **pcDNA 3.1** (Invitrogen): Control negativo de transfección. rβ-MS2 para la generación de C4.
- **pCMV Sport6** (Invitrogen): HuR, IMP1, NPM, G3BP, IF1 y H49K.
- **pEGFP-C2** (Clontech, Mountain View, CA, EE.UU.): preβ-GFP-3'β, preβ-GFP y GFP-CP-nls

1.6. Oligonucleótidos

Se adquirieron 5 U de absorbancia a 260nm de cada oligonucleótido, purificados por HPLC (Invitrogen) y liofilizados. Para generar una disolución de almacenamiento el liofilizado se resuspendió a 4°C con el volumen suficiente de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 2 mM) para obtener una concentración final del oligonucleótido de 100 µM y se conservó a -20°C. La disolución de trabajo fue 1/10 de la anterior en H₂O estéril. Los oligonucleótidos HisMBP-CP-5' y HisMBP-CP-3' están modificados con una fosforilación en 5'. En la Tabla MM1 se proporciona una lista de los oligonucleótidos que se han usado en este trabajo incluyendo la utilidad que se les ha dado.

Nombre	Orientación	Secuencia	Utilidad	Tm (°C)	Long. (nt)
hB3 Apa (Fw)	SS	CGGGGGCCGGGTAGCTCTGACTG	C / hβ3-MS2	45	24
hB3 R1 (Rv)	AS	CGCGAATTCCTGCAGGATCTTTTG	C / hβ3-MS2	39	24
HisMBP-CP-5'	AS	CTGAGAACCCCGCATAAATCTATGTCCTTGTTGGTGAAGT	C / His-MBP-CP	54	40
HisMBP-CP-3'	SS	CATCATCATCATCATGGTATGAAAACTGAAGAAAGTAAACTGGTA	C / His-MBP-CP	54	45
Ptac fw	SS	CATCGGCTCGTATAATG	S / His-MBP-CP	45	17
SP6	AS	ATTTAGGTGACACTATAG	C / IF1-H49K; S; CH	41	18
T7 Pcmvspot6	SS	TAATACGACTCACTATAGGG	C / IF1-H49K; S; CH; Trans. in vitro	48	20
MS2 rv	AS	GAATCCGTACCCTGATGGTG	Trans. in vitro; qPCR	54	21
V1.5	SS	GGACTTTCAAAAATGTCG	S	46	18
XL39	AS	TAATCCTGTCCGACCACCCC	Molde TNT; S	54	20
MS2h-DraI (fw)	SS	CGCTTTAAAGGATCCGATATCCGT	C / rβ-MS2	42	24
MS2h-DraI (rv)	AS	CGCTTTAAAGAATTCCGTACCCCTG	C / rβ-MS3	42	24
5-rBUTR-BglII	SS	GCGAGATCTGGGCCCTTCAGCCAA	C / βgal-MS2-3'β	47	24
T3	AS	AATTAAACCCTCACTAAAGGG	C / βgal-MS2-3'β; CH; S	48	20
5'-hB-Ex1-2-fw	SS	GTCCATCCTGTCAGGGAC	RT-semi-qPCR	53	18
3'hB-Ex3-2-rv	AS	TGCTCTCACCCCAAATGCTG	RT-semi-qPCR	51	19
5'-rBEx2-3 fw	SS	CCAGCATTTAGGGGAGAGC	CH / C4; RT-semi-qPCR	53	19
3'-rBEx3-4 rv	AS	AGGAGCGAATTGTTTGGT	CH / C4; RT-semi-qPCR	46	18
IF1-H49K-fw	SS	AACACAAGGAAGAAGAAATCGTTC	C / H49K	52	24
IF1-H49K-rv	AS	GAACGATTTCTTCTTCCTTGTT	C / H49K	52	24
ratActB-qPCR-fw	SS	TGAACCCCTAAGGCCAACCG	qPCR-SyBR	53	19

ratActB-qPCR-Rv	AS	AGGTCTCAAAACATGATCTGGGTC	qPCR-SyBR	55	23
ratCOXI-qPCR-fw	SS	TAGGACAGCCAGGGGCAC	qPCR-SyBR	55	18
rat12S qPCR fw	SS	GCAAACATCCATAAACCGGTGT	qPCR-SyBR	53	22
rat12S qPCR Rv	AS	CCCTCTCCTTAAGTTTTAGGCAAATC	qPCR-SyBR	56	26
rB-qPCR-L	SS	AAAGCTGGTGCCCTGAAG	qPCR-SyBR	53	19
rB-qPCR-R	AS	GGAGATGGTCATAGTCACCTGCT	qPCR-SyBR	57	23
MS2h-qPCR-L	SS	CCATCAGGGTACGAGCTAGCC	qPCR-SyBR	58	21
hB-qPCR-L	AS	CAGCAGATTTTGGCAGGTG	qPCR-UPL	51	19
hB-qPCR-R	SS	CTTCAATGGGTCCACCATA	qPCR-UPL	52	20
hp21-qPCR-L	AS	CGAAGTCAGTTCCTTGTGGAG	qPCR-UPL	54	21
hp21-qPCR-R	SS	CATGGGTTCTGACGGACAT	qPCR-UPL	51	19
hHSP60-qPCR-L	AS	TGCTATGGCTGGAGATTTTGT	qPCR-UPL	50	21
hHSP60-qPCR-R	SS	CAGCAGCATCCAATAAAGCA	qPCR-UPL	50	20
hGAPDH-qPCR-L	AS	AGCCACATCGCTCAGACAC	qPCR-UPL	53	19
hGAPDH-qPCR-R	SS	GCCCAATACGACCATAATCC	qPCR-UPL	51	19
GFP-qPCR-L	AS	GAAGCGCGATCACATGGT	qPCR-UPL	50	18
GFP-qPCR-R	SS	CCATGCCGAGAGTGATCC	qPCR-UPL	52	18
h12S-qPCR-L	AS	CCCAGGGTTGGTCAATTC	qPCR-UPL	51	19
h12S-qPCR-R	SS	CTTTACGCCGGCTTCTATTG	qPCR-UPL	52	20
h18S-qPCR-L	AS	GCAATTATTCCTCCCATGAACG	qPCR-UPL	50	20
h18S-qPCR-R	SS	GGGACTTAATCAACGCAAGC	qPCR-UPL	52	20

Tabla MM1: Oligonucleótidos. Nombre: incluye un nombre resumido del amplicón (*h* gen humano, *r* rata), la región del molde con la que hibrida (5' ó 3', L o R), el nombre de la diana de restricción, la orientación respecto al molde (fw o rv) y si se usa para PCR cuantitativa (qPCR). Orientación: respecto al molde (SS, igual orientación; AS, orientación contraria). Secuencia: dirección 5' a 3', diana de restricción subrayada. Utilidad: C/, clonación y a continuación la construcción; S, secuenciación; CH, chequeo de recombinantes; Trans *in vitro* y Molde TNT, generación de moldes; qPCR, PCR cuantitativa con sonda SYBR green o de UPL.

1.7. Radioisótopos

Las moléculas marcadas con radioisótopos se compraron a GE Healthcare (Waukesha, WI, EE.UU.), se conservaron a 4°C y se usaron durante el periodo de vida media correspondiente (aproximadamente 2 semanas para ^{32}P y 3 meses para ^{35}S).

- Redivue 5'-[$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP: Sondas de RNA para ensayos de interacción *in vitro*.
- Redivue 5'-[$\alpha^{32}\text{P}$]-ATP: *northern* y *slot blot*.
- Redivue Promix *in vivo* cell labelling mix: Marcaje metabólico de proteínas, traducción *in vitro* y expresión de proteínas en sistema eucariótico.

2. Métodos

2.1. Biología molecular

2.1.1. Aislamiento de DNA de cultivos bacterianos

La preparación de DNA plasmídico para el cribado de clones se efectuó por el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (Sambrook y Russell, 2001). Las preparaciones de plásmidos para clonaciones, secuenciación o transfección se realizaron utilizando distintos kits dependiendo del volumen de cultivo saturado de bacterias de partida: QIAprep spin Miniprep kit (2 ml de cultivo) y Plasmid Midi Kit (50 ml) de QIAGEN (Hilden, Alemania) y Jet Star plasmid DNA purification maxi kit 2.0 (150 ml) de Genomed (Löhne, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.1.2. Cuantificación, calidad, ingeniería y electroforesis (EF) de DNA

La cuantificación de DNA se realizó mediante la medida de absorbancia a 260nm (A_{260}) y por comparación respecto a un patrón conocido en EF. La calidad de las preparaciones de DNA se valoró siguiendo varios criterios: (i) no contaminación de proteínas ($A_{260}/A_{280} > 1,9$), (ii) no contaminación de polisacáridos ($A_{260}/A_{230} > 1,9$), (iii) no contaminación de RNA (EF), (iv) forma plasmídica mayoritaria circular superenrollada (EF) y cantidad de DNA genómico despreciable (EF).

Las **digestiones** del DNA con enzimas de restricción se llevaron a cabo en los tampones y a las temperaturas recomendados por el fabricante (Roche, Mannheim, Alemania) manteniendo una concentración de glicerol < 10%. La **purificación** del DNA se realizó por extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol 100% (Sambrook y Russell, 2001). La **separación de los fragmentos** generados por digestiones en más de un sitio de restricción se llevó a cabo por EF en geles de agarosa o acrilamida. Para la **purificación de los fragmentos** se corre en paralelo una alícuota que se tiñe y sirve como referencia de la movilidad del fragmento. Los fragmentos utilizados para realizar clonaciones no recibieron ningún tipo de irradiación UV durante el proceso de purificación de gel de agarosa. Para la purificación de fragmentos en geles de **agarosa** se usó el kit QIAquick gel extraction kit (QIAGEN). Para la purificación de fragmentos pequeños de DNA de geles de **poliacrilamida** se trocearon las bandas recortadas y se eluyó el DNA mediante la incubación con tampón de elución (acetato amónico al 0,5%, acetato magnésico 10 mM, EDTA 1 mM, SDS al 0,1 % (p/v)) a 37°C con agitación constante durante 8h. Después, se filtró el sobrenadante y se precipitó el DNA con etanol 100% (Sambrook y Russell, 2001). La **desfosforilación** de los extremos digeridos del vector se llevó a cabo con 0,5 U de fosfatasa alcalina (CIP) (Roche) 30min a 37°C. La fosfatasa se inactivó a 55°C 1h y el DNA se purificó mediante fenolización y precipitación o EF. Para **enrmar** extremos cohesivos con 5' o 3' protuberantes se utilizó 1U del fragmento Klenow de la DNApol I o de la T4 DNA polimerasa (Roche), respectivamente, 30min a 37°C. Las **ligaciones** se realizaron en una relación molar 1/3 de vector/inserto durante 5 min a temperatura ambiente con el Quick ligation kit (New England Biolabs). Las **transformaciones** se realizaron con 1ng de plásmido puro o con la mitad de la ligación (50-100ng de vector + inserto) mediante choque térmico en bacterias competentes por el método químico con RbCl (Sambrook y Russell, 2001).

La **EF** del DNA plasmídico o fragmentos de gran tamaño se realizó en geles de **agarosa** en tampón TAE (Tris-acetato 40mM, EDTA 2 mM). La calibración de la cantidad de DNA y del tamaño de las moléculas de DNA se realizó mediante la EF en paralelo de una mezcla de fragmentos de DNA de longitud y cantidad conocidas resultante de la digestión del DNA de los fagos λ y $\Phi 29$ con Hind III. La separación de fragmentos pequeños (< 0,2 kb) se realizó mediante **EF** nativa en geles de **poliacrilamida** 5% en TAE y a 70V, con una mezcla calibradora comercial de fragmentos de DNA GeneRuler 50 bp DNA ladder (Fermentas, Burlington, Canadá). El DNA de ambos tipos se tiñó posteriormente incubando el gel en una solución de bromuro de etidio 1,5 μ g/ml.

2.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las amplificaciones por PCR a tiempo final se llevaron a cabo mediante un termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Alemania). Las amplificaciones a tiempo real (qPCR) en capilares se llevaron a cabo en un termociclador LightCycler Systems for Real-Time PCR (Roche). Las amplificaciones a tiempo real en placa se llevaron a cabo en ABI PRISM 7900HT SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

2.1.3.1. Amplificación para clonaciones

Las amplificaciones se realizaron con 2,5 U de la Taq polimerasa de alta fidelidad Expand High Fidelity PCR system (Roche) usando como molde 5 ng de plásmido puro en un volumen final de reacción de 50 μ l, conteniendo $MgCl_2$ 1,5 mM, 0,1 μ M de cada oligonucleótido y 0,1mM de cada dNTP en un tampón proveído por el fabricante. La T_m para cada reacción es la del oligonucleótido de T_m más baja de la pareja (Tabla MM1) y el tiempo de elongación 1 min/kb. Protocolo: 1 ciclo de desnaturalización inicial (2min a 94°C), 10 ciclos de amplificación (15seg 94°C, 30seg de anillamiento, elongación a 68°C), 20 ciclos de amplificación en los que añade 5 seg de tiempo de elongación por cada ciclo sucesivo y elongación final (7min, 72°C).

2.1.3.2. PCR inversa

Se utilizaron los oligonucleótidos HisMBP-CP-5' y HisMBP-CP-3. Estos son solapantes en su mitad 5' e hibridan con 2 tramos de secuencia contiguos del molde en orientación invertida. Además, estaban fosforilados en 5'. La PCR se llevó a cabo con 10 ng de molde pMAL-CP y con 2,5U de la Pfu polimerasa (Stratagene). Se usa un programa estándar pero con un tiempo de elongación de 10 min en cada ciclo de amplificación.

2.1.3.3. Mutagénesis dirigida

Es una variación de la anterior pero, en lugar de copiar el plásmido entero con una sola PCR mutagénica, se realizaron dos amplificaciones solapantes con oligos externos usando como molde 10 ng de pCMV-IF1. Brazo izquierdo: oligonucleótidos IF1-H49K-fw y T7 Pcmvsport6, T_m = 43°C y tiempo elongación 20

seg; Brazo derecho: oligonucleótidos IF1-H49K-rv y SP6, $T_m = 37^\circ\text{C}$ e igual tiempo de elongación. Las amplificaciones se realizaron con 2,5 U de la Taq polimerasa de alta fidelidad Expand High Fidelity PCR system (Roche)

2.1.3.4. Cribado de clones recombinantes

El cribado inicial de clones recombinantes tras una ligación se realizó por PCR. En un volumen de reacción de 25 μl se introducen bacterias extraídas directamente de una colonia crecida en LB-Agar. La reacción contenía MgCl_2 2 mM, dNTPs 0,2mM cada uno, 1 U/ μl Taq (Biotools B&M, Madrid, España) y 0,2 μM de cada oligonucleótido (uno interno, del inserto, y otro externo, del vector). Programa: desnaturalización inicial (10min a 94°C), 20-25 ciclos de amplificación (15 seg 94°C , 15 seg T_m del oligo de T_m inferior, 0,5 – 1min 72°C) y elongación final (3 min, 72°C). Se intentaron escoger amplicones cortos para minimizar el tiempo total del programa de amplificación.

2.1.3.5. Producción de molde para síntesis *in vitro* de macromoléculas y ribosondas

Se usó como molde 5 ng de un plásmido que contiene la construcción que queremos transcribir *in vitro* y el promotor de la T7 RNA polimerasa: pBluescript (h β -mRNA, hUTR, h β 3 y sus correspondientes híbridos con MS2), pCMV-Sport 6 XL5 (NPM, HuR, G3BP). Las amplificaciones se realizaron con Expand High Fidelity PCR system (Roche) con los mismos criterios que se indican en la sección 2.1.3.1. Se usaron los oligonucleótidos que se indican en la Tabla MM1 (Utilidad Trans. *in vitro* y Molde TNT).

2.1.3.6. RT-PCR

Para la producción de cDNA a partir de RNA se usaron reactivos de Roche. En esta reacción se usó como molde 1 μg de RNA puro y no degradado (chequeado por EF o EF capilar) en un volumen de reacción de 20 μl que contiene: MgCl_2 5mM, tampón PCR II 1X, dNTPs 1mM de cada uno, 1 U/ μl de inhibidor de RNAsas, hexámeros al azar 2,5 μM y 2,5 U/ μl de la transcriptasa en reverso MuLV. Se realizó un protocolo de un solo ciclo: anillamiento y extensión (10 min 25°C), transcripción reversa (40 min 42°C) y desnaturalización (5 min 94°C).

2.1.3.7. PCR cuantitativa (qPCR) y semi-qPCR

Las reacciones de PCR en tiempo real con la sonda SYBR Green (Applied Biosystems) se realizaron a partir de 5 ng de cDNA en un volumen final de 10 μ l conteniendo la SYBR Master mix 1X complementada con 0,5 mM de $MgCl_2$ adicional y con 0,5 μ M de cada oligonucleótido. El protocolo consistió en un ciclo de desnaturalización inicial (10 min 95°C), 40 ciclos de amplificación (15 seg, 95°C; 1 min, 60°C de anillamiento y extensión; adquisición de fluorescencia) y un paso final de aumento gradual de la temperatura (0,1°C/seg) hasta 95°C (*melting curve*). Las reacciones usando las sondas de la colección Universal Probe Library de Roche (Mannheim, Alemania) se llevaron a cabo con 5 ng de cDNA, 0,5 μ M de cada oligonucleótido, Taq-man mix 1X y 0,1 μ l de la sonda correspondiente al gen. Para la cuantificación de β -F1-ATPasa se usó la sonda #14, para Hsp60 la #31, para GAPDH la # 60 y para 18S la #48. El protocolo fue el mismo que el utilizado con SYBR Green pero sin curva de *melting*. La eficiencia de los oligonucleótidos se determinó empíricamente y se tuvo en cuenta para la cuantificación por el método $\Delta\Delta C_t$ (Livak y Schmittgen, 2001). En los experimentos de cuantificación absoluta, se incluyó una curva calibradora con diluciones seriadas (factor de dilución 1/4) de un amplicón de concentración conocida. Las reacciones de PCR semi-cuantitativa se realizaron con 10 ng de cDNA sin purificar de la RT como molde en un volumen final de 25 μ l, añadiendo 1,6 mM extra de $MgCl_2$ (concentración final de 2mM), 0,2 μ M de cada oligonucleótido y 1 U/ μ l Taq (Biotools B&M). Para cada gen se realizó una amplificación piloto a 30 ciclos en las que se analizaron alícuotas a 18, 22, 26 y 30 ciclos para establecer el periodo lineal de amplificación. Los criterios para el protocolo fueron los mismos que los descritos en el punto 2.1.3.4.

2.1.4. Clonaciones

Todas las construcciones que se describen a continuación han sido secuenciadas por el Servicio de Genómica del Parque Científico de Madrid.

2.1.4.1. RNAs híbridos (hRNAs)

Para la generación de las construcciones de los RNAs híbridos la Dra. Robin Reed (Harvard Medical School, USA) nos entregó amablemente un clon que contiene 3 horquillas de unión a la proteína de la cápsida del fago MS2 en el plásmido pCR2.1 introducido como producto de PCR con adeninas protuberantes en 3'. La construcción hUTR-MS2 se generó a partir del 3'UTR humano clonado en Apal-

EcoRI en pBluescript II SK (+) introduciéndole el fragmento BamHI-XbaI de pCR2.1-MS2. La construcción h β -mRNA-MS2 se generó a partir de cDNA completo de beta clonado en pBluescript II SK (+) en XhoI-PstI (la clonación generó un nuevo sitio EcoRI en dirección 3' a PstI) introduciéndole el fragmento EcoRI-EcoRI de pCR2.1-MS2. La construcción h β 3-MS2 se generó amplificando en primer lugar el fragmento β 3 (Ricart y cols., 2002) y clonándolo en ApaI-EcoRI en pBluescript II SK (+), e introduciéndole después el fragmento EcoRI-EcoRI de pCR2.1-MS2.

2.1.4.2. His-MBP-CP

El plásmido pMAL-C contenía la secuencia codificante de la CP con tres mutaciones en StuI-HindIII (el sitio StuI se perdió por ser corte romo). Las mutaciones consisten en la delección dIFG y V29I, que evitan homooligomerización de la CP (Peabody y Ely, 1992), y A81→G68. Para introducir una cola de His en el extremo Nt de la proteína de fusión se copió el plásmido usando oligos fosforilados en 5' que contenían la secuencia para 5 His (ver sección 2.1.3.2 y Tabla MM1). Éstos contenían una mitad 3' que hibrida en un caso con la región de 27 nucleótidos que incluyen el ATG iniciador y los 24 sucesivos, y en el otro con los 27 nucleótidos en 5' al ATG iniciador; en la región 5' contenían unas colas que no aparean con el plásmido y que generan un inserto de cinco His bajo un ATG iniciador en fase con la secuencia de la proteína de fusión. La amplificación se realizó con la Pfu DNA polimerasa por ser una polimerasa termoestable de alta fidelidad que deja extremos romos. El DNA purificado se trató con DpnI con objeto de digerir el plásmido molde y finalmente se ligó el fragmento amplificado. Además de los chequeos ordinarios antes de la selección y conservación de los clones recombinantes se valoró en éstos la capacidad de inducir la expresión de la proteína con IPTG (1mM) en mini-preparaciones. El DNA plasmídico del clon seleccionado se transformó en la cepa BL21 y M15 pREP4.

2.1.4.3. IF1-H49K

Para la generación del mutante puntual H49K se sustituyeron 2 nucleótidos de la secuencia de IF1 wt. Para ello se generó un fragmento con la mutación que se sustituyó por restricción por el wt (ver Fig. 27). La modificación se introdujo en dos oligonucleótidos “mutagénicos” solapantes y en orientación invertida. El fragmento mutante se crea a partir de dos brazos generados por dos PCRs mutagénicas (ver sección 2.1.3.3). Los productos de estas PCRs (la tercera parte) se purifican, se mezclan 1:1 y se incuban 5 min a 94°C y 30 min a 37°C para que se separen las

hebras y se re-anillan. A continuación, se añaden los dNTPs y el fragmento Klenow de la DNA pol I a una concentración final de 1,75 mM y 1 U/μl, respectivamente, y se incuba 30 min más a 37°C para que se produzca la extensión de los fragmentos (Fig. 27). Una porción de esta reacción (la tercera parte) se usa como molde para una PCR con los oligonucleótidos externos T7 y SP6 según la sección 2.1.3.1. El fragmento mutante se purifica, se digiere con EcoRI y NotI y se liga con el vector digerido con las mismas enzimas.

2.1.4.4. rβ-MS2

Por un lado, se generó el fragmento MS2 por PCR usando pCR2.1-MS2h como molde y los oligonucleótidos MS2h-DraI (fw) y MS2h-DraI (rv) según la sección 2.1.3.1. El producto de la PCR se purificó y digirió con DraI. Por otro lado, para introducir el fragmento en el sitio DraI del 3'UTR de rβ, hay que tener en cuenta que esta enzima corta tres veces en el vector pcDNA3. Por esta razón, se sacó rβ del vector mediante digestión con KpnI y XbaI; se reservó el vector y el inserto purificado se digirió con DraI. Los fragmentos generados por esta digestión se ligaron directamente con MS2h. Finalmente, una parte de esta ligación (una tercera parte) se ligó con el pcDNA digerido con KpnI y XbaI que habíamos reservado.

2.1.4.5. βGal-3'β-MS2

Para la clonación de este gen reportero el Dr. Keneth S. Kosik (Harvard Medical School, Boston, MA, EE.UU.) nos proporcionó un vector de expresión eucariótico (promotor RSV) que contenía β-galactosidasa con 7 sitios MS2 fusionados en 3' y, a continuación, el 3' UTR de Ca-Calmodulina-quinasa (Rook y cols., 2000). Este vector se digirió con BglII y Not I para sacar el 3' UTR de Ca-Calmodulina quinasa. Usando como molde el 3'UTR de rata de β-F1-ATPasa clonado en pBluescript (Izquierdo y Cuezva, 1997) se realizó una PCR con los oligos 5-rBUTR-BglII y T3 (secc. 2.1.3.1). El producto se purificó y digirió con BglII y NotI, y el fragmento de 0,16 kb se purificó para ligarlo con el vector de β-gal-MS2.

2.1.5. Expresión de proteínas recombinantes en bacterias

Para la producción de **MBP-CP** se inoculó un cultivo saturado de BL21 1/100 en LB-Glucosa 10mM y ampicilina 100 μg/ml, se indujo el cultivo creciendo en fase exponencial con IPTG 0,3 mM y se dejó expresar durante 2h. Las células

se precipitaron centrifugando 20 min a 4.000g a 4°C y el precipitado de bacterias se reservó a -20°C. La bondad de la inducción se valoró por EF y tinción con Coomassie Brilliant Blue de un extracto total de bacterias, antes y después de la inducción, correspondiente a 0,2 ml de cultivo a $A_{600}=0,5$. Para la producción de **His-MBP-CP** se inoculó una colonia en medio de autoinducción ZYM-5052 (Studier, 2005) y se dejó crecer toda la noche. La valoración de la inducción y el procesamiento del cultivo fue el mismo que en el caso anterior.

2.1.6. Detección específica de RNA (*Northern y slot blot*)

Para el análisis por ***northern blot*** se separaron ~30 µg de RNA total mediante electroforesis en geles de 1,4% agarosa-formaldehído. El RNA desnaturalizado se transfirió a membranas de nylon GeneScreenTM (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE.UU.) mediante vacío y se fijó a las membranas a 80°C. Posteriormente las membranas se pre-hibridaron durante 2 horas en un medio que contiene: 50% formamida, PIPES 20 mM, NaCl 800 mM, EDTA 2 mM, 0,5% SDS y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón, para ser luego hibridadas con los distintos cDNAs marcados con [³²P] en el mismo medio durante la noche a 42 °C. Tras la hibridación, las membranas se lavaron durante 10 min a temperatura ambiente con 6xSSC (SSC 1x es NaCl 150 mM y citrato sódico 15 mM), 10 min a 65°C con 2xSSC + 0,1% SDS y, en caso de necesitar otro lavado, 10 min a 65°C con 0,1xSSC + 0,1% SDS. Todas las membranas se expusieron a películas radiográficas AGFA (x-ray Film RP-2) a -70°C durante distintos tiempos con pantallas de tungsteno (Dupont Cronex Lighting Plus XL). Las membranas se deshibridaron durante 15 min a 95°C en agua estéril para, posteriormente, y tras ser comprobada la ausencia de señal de las sondas empleadas, poder ser re-hibridadas frente a otra sonda según lo descrito anteriormente. La cuantificación de la intensidad de las bandas resultantes que estaban dentro del rango lineal de la película se determinó utilizando el programa Kodak Digital Science 1D, siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación relativa de RNAs fraccionados en gradiente de densidad por ***slot blot*** se realizó con el aparato Minifold II slot blotter siguiendo las instrucciones del fabricante (Schleider & Schuell, Keene, EE.UU.) con alguna modificación (Luis y cols., 1993). Se procesó el mismo volumen de cada fracción y la prehibridación e hibridación de las membranas se llevó a cabo como se acaba de describir. El marcaje radiactivo de las sondas de DNA se llevó a cabo mediante el método de ***nick translation*** (Sambrook y cols., 2001) utilizando como molde 100 ng de DNA digerido o de producto de PCR y 50 µCi de α-[³²P]-dCTP. Las sondas que se usaron tenían en todos los casos una actividad específica mayor a 10⁸ cpm/µg.

2.2. Bioquímica de proteínas

2.2.1. Extracción de proteínas de muestras biológicas

Aproximadamente, 20 secciones de las muestras de adenocarcinoma y carcinoma escamoso de pulmón del IDIBAPS se extrajeron en 300 µl de solución de lisis (Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, NP-40 1%, Desoxicolato sódico 0,5%, EDTA 0,4 mM, NaF 10 mM, PMSF 0,75 mM, leupeptina 1 µg/ml, antitripsina 1 µg/ml y aprotinina 1 µg/ml) durante 25 min en hielo y se centrifugaron durante 30 min a 16.000 g a 4°C.

Las muestras de los tumores de piel se pesaron y, sin permitir que se descongelasen, se pulverizaron en N₂ (l). La extracción de proteína del polvo se realizó en una proporción 1/6 ó 1/8 (mg/µl) en solución de rehidratación de bi-dimensionales (ver secc. 2.2.3) durante 30 min, seguido de tres ciclos de congelación y descongelación. El extracto se clareó centrifugando 20 min a 16.000g a 4°C y las muestras se alicuotearon y conservaron a -80°C.

Las secciones escogidas de los carcinomas de mama para la extracción de proteína fueron teñidas con hematoxilina y analizadas por un patólogo seleccionando para el estudio aquéllas que tuvieran >90% de celularidad del tumor evitando zonas necróticas, fibróticas y/o de inflamación. Las muestras (secciones de tejido congeladas de 50-60 mg de peso húmedo) se pulverizaron en frío y la proteína se extrajo igual que para el caso de los tumores de piel.

2.2.2. Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteína total de los extractos biológicos se determinó mediante el reactivo de Bradford (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante usando una solución de concentración conocida de BSA como patrón de referencia. Para la cuantificación de la proteína presente en muestras disueltas en solución de rehidratación de bi-dimensionales (secc. 2.2.1 y 2.2.3) se utilizó una variación de este método (Weekes y cols., 1999).

2.2.3. Electroforesis de proteínas mono (SDS-PAGE), bi-dimensional (IEF-SDS-PAGE) y en condiciones nativas.

Las proteínas se fraccionaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS según el método descrito por Laemmli (Sambrook y Russell, 2001). La calibración de la movilidad de las proteínas en los geles se efectuó mediante electroforesis en paralelo de un conjunto de proteínas teñidas de peso molecular conocido: 200, 97, 66, 45, 30, 21.5, y 14.3 kDa (Rainbow markers, GE Healthcare) o sin teñir (SDS-PAGE MW standards, broad range, BioRad).

En el caso de geles bi-dimensionales, las muestras se diluyeron en 200 µl de solución de rehidratación (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 2%, mezcla de anfolitos comercial rango de pH 4-7 (Pharmalyte 4-7, GE Healthcare), EDTA 1 mM, DTT 65 mM, azul bromofenol 0,002%, PMSF 1mM, inhibidores de proteasas (Complete Mini EDTA-free, Roche)) y se dejaron en contacto con tiras de acrilamida con un gradiente de pH 4-7 o 3-10 inmovilizado (IPG strips 4-7, GE Healthcare) durante 14 h. El enfoque de las proteínas en el gradiente de pH (1ª dimensión) se realizó durante 20 min a 300 V, 10 min a 1.000 V, 45 min a 2.000 V, 20 min a 3.000 V y 3,5 h a 3.500 V, fijando la potencia a 5W y la corriente a 0,5 mA por cada tira. Las tiras se conservaron a -80°C hasta que se realizó la segunda dimensión. Antes de realizar la segunda dimensión las tiras se equilibraron 15 min en 10 ml de solución de equilibrado (Tris 50 mM pH 8,8, SDS 2%, urea 6M, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%) con 100 mg de DTT y otros 15 min en 10 ml de solución de equilibrado con 250 mg de yodo-acetamida. La segunda dimensión se realizó en geles de acrilamida de 13 cm sin gel concentrador en condiciones desnaturalizantes fijando la corriente a 20 mA y en la cámara fría.

La separación de complejos por EF en condiciones nativas (EMSA, Electrophoretic mobility shift assay) se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 5% en TBE 1X (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM) generados a partir de una mezcla de acrilamida: bisacrilamida 37%:1%. Antes de cargar las muestras en los geles se realizó una pre-carrera durante 30 min a 4°C a 200 V usando TBE 0,5X como tampón de carrera. La EF de las muestras se llevó a cabo a 250 V con TBE 0,5X y a 4°C.

2.2.4. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.

Las proteínas resueltas en geles de poliacrilamida se visualizaron por tinción con AgNO_3 o con azul de Coomassie. La **tinción con azul de Coomassie** se llevó a cabo incubando el gel 5-14h en solución de tinción (Metanol 40%, Acético 10%, Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2% p/v) preparada en el momento y haciendo 3-6 incubaciones de 10 min en solución de destinción (Metanol 25%, Acético 10%), una incubación 12-48h a 4°C con solución de destinción lenta (Metanol 5%, Acético 7,5%) y conservándolo finalmente en solución de almacenamiento (Acético 1%) a 4°C. La **tinción con AgNO_3** se llevó a cabo básicamente siguiendo el protocolo PlusOne (GE Healthcare) introduciendo, en algunos casos, modificaciones indicadas por el propio fabricante. Estas modificaciones se han introducido para minimizar la modificación de las proteínas en los pasos de fijación y tinción, ya que generalmente conlleva un descenso en el rendimiento de la digestión triptica y la elución de los péptidos para el análisis por espectrometría de masas. Brevemente, el protocolo fue como sigue: (i) fijación, 30 min con etanol 40%, acético 10%; (ii) sensibilización, 30 min tiosulfato sódico 0, 2% p/v, acetato sódico 0,5 M; lavados, 3 de 5 min con H_2O ; (iii) reacción con plata, 20 min AgNO_3 0,25% a 4°C y protegido de la luz; lavados, 2 de 1 min con H_2O ; (iv) revelado, varios cambios (sobre todo cuando se pone amarilla la solución) con NaCO_3 2,5%, HCHO 0,04%; (v) parada, 10 min EDTA-Na_2 40mM; lavados, 3 de 5 min con H_2O . Finalmente, se pone en solución de almacenamiento y se conserva a 4°C. Todas las soluciones se prepararon en el momento, con H_2O mQ y las incubaciones se llevaron a cabo en recipientes de cristal con objeto de optimizar la compatibilidad con el proceso de secuenciación y minimizar las probabilidades de contaminación.

2.2.5. Detección inmunológica de proteínas (*Western blot*, WB)

Las proteínas fraccionadas en geles mono- o bi-dimensionales se transfirieron a membranas de PVDF (0,45 μm de poro) mediante electro-transferencia semiseca o húmeda. Para la transferencia semi-seca se utilizó un equipo de Pharmacia-LKB empleando una intensidad de corriente de 1 mA/cm^2 de superficie de gel y en tampón de transferencia (Glicina 39 mM, Tris-HCl 48 mM, metanol 20% (v/v) y 0,0375% SDS) durante 90 min a temperatura ambiente. Para la transferencia húmeda se utilizó un equipo Mini Trans Blot de Bio-Rad y en el mismo tampón de transferencia pero sin SDS. En este caso la transferencia se efectuó a 100 V durante 45 min a 4°C. A continuación, las membranas se incubaron en solución de bloqueo (leche desnatada liofilizada al 5% p/v diluida en TBS (Tris-HCl 50 mM pH

Antígeno	Swiss-Prot	P.M.	Especie	Origen	Clon	Productor	Utilidad (dilución)
<i>β-F1-ATPasa</i>	ATPB_HUMAN (P06576)	52 kDa	H, R	Conejo	Policlonal	J.M.Cuezva	WB (1:20,000); IP (1:100)
<i>Hsp60</i>	CH60_HUMAN (P10809)	60 kDa	H, R	Ratón	SPA-807	Stressgene	WB (1:5,000); IP (1:100)
<i>COXI</i>	COX1_HUMAN (P00395)	39 kDa	H, R	Ratón	1D6	Molecular Probes	WB (1:100)
<i>COXIV</i>	COX41_HUMAN (P13073)	17 kDa	H, R	Ratón	20E8	Molecular Probes	WB (1:100)
<i>IF1</i>	ATIF1_HUMAN (Q9UII2)	12 kDa	H	Ratón	5E2	Molecular Probes	WB (1:500)
<i>GAPDH</i>	G3P_HUMAN (P04406)	35 kDa	H, R	Ratón	6C5	Abcam	WB (1:15,000)
<i>PK-M</i>	KPYM_HUMAN (P14618)	59 kDa	H, R	Cabra	Policlonal	Abcam	WB (1:2,000)
<i>HuR</i>	ELAV1_HUMAN (Q15717)	36 kDa	H, R	Ratón	3A2	Santa Cruz Biotech.	WB (1:400); IP (1:200); ME (1:4)
<i>PABP</i>	PABP1_HUMAN (P11940)	70 kDa	H, R	Conejo	Policlonal	A. Nieto	WB (1:1,000)
<i>AUF1</i>	HNRPD_HUMAN (Q14103)	38 kDa	H	Ratón	T-10	Santa Cruz Biotech.	WB (1:100); IP (1:50)
<i>AKAP149</i>	AKAP1_HUMAN (Q92667)	149 kDa	H	Ratón	6	BD Biosciences	WB (1:200); IP (1:100)

Tabla MM2: Anticuerpos. En la tabla se indica el antígeno que reconoce el anticuerpo, el nombre y número de referencia en la base de datos swissprot (<http://beta.uniprot.org>), peso molecular aparente (P.M.) que muestra en SDS-PAGE, las especies cuyo antígeno es capaz de reconocer el anticuerpo, el idiotipo del anticuerpo (origen), el nombre del clon (cuando es monoclonal) y la compañía o laboratorio donde fue producido. Se incluye además la utilidad que se les ha dado en esta tesis y la dilución a la que se ha empleado. WB, *western blot*; IP, inmunoprecipitación, ME, microscopía electrónica.

7,5, NaCl 150 mM) más 0,1% Tween-20) durante al menos 1 hora con agitación y a temperatura ambiente. La incubación de la membrana con el anticuerpo se efectuó a temperatura ambiente durante 1 hora o durante toda la noche a 4°C, dependiendo del anticuerpo. Los anticuerpos fueron diluidos en TBS más albúmina bovina al 3% y NaN_3 1 mM. Los anticuerpos usados en esta tesis y las diluciones están resumidos en la Tabla MM2.

A continuación, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min con TBS-Tween (0,1%). Posteriormente, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra contra la región Fc de las IgGs de conejo, o de un anticuerpo de conejo contra la región Fc de las IgGs de ratón o de cabra, dependiendo del anticuerpo primario utilizado, conjugados ambos a peroxidasa (Nordic Immunology (Tilburg, Holanda), 1:5.000), en solución de bloqueo. Las proteínas inmunoreactivas se visualizaron utilizando el método quimioluminiscente del ECL (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la intensidad de las bandas resultantes que estaban dentro del rango lineal de la película se determinó utilizando el software Kodak Digital Science 1D.

2.2.6. Fluorografía de proteínas marcadas en geles de poliacrilamida

La detección de proteínas marcadas con emisores β de baja energía (^{35}S) se efectuó mediante fluorografía utilizando como fluoróforo el ión salicilato (Sambrook y Russell, 2001). Brevemente, el gel se incubó durante 30 min con medio de fijación (secc. 2.2.4) y se lavó posteriormente dos veces con agua destilada durante 15 min. A continuación, el gel se incubó durante 1 h en salicilato sódico 1 M y se secó mediante vacío y calor. El gel seco se expuso sobre películas autorradiográficas a -70°C.

2.2.7. Purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad.

Para la purificación de MBP-CP del precipitado de bacterias (ver secc. 2.1.5), éste se resuspendió rápidamente en 10 ml de buffer de columna (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, β -mercaptoetanol 10 mM) por cada gramo de peso húmedo de células. Para generar el extracto total proteico, las células se lisaron congelando y descongelando, y sonicando posteriormente durante 3 min en pulsos de 15 seg. El material insoluble se precipitó centrifugando 30 min a 9.000g a 4°C.

La solubilidad de cada proteína se valoró por EF y tinción con azul de Coomassie de muestras equivalentes del homogenado total antes de la centrifugación, del sobrenadante clareado y del material insoluble. El extracto crudo clarificado con una concentración de proteína total ajustada aproximadamente a 2,5 mg/ml se incubó 1h con 10 ml de resina de amilosa (New England Biolabs) que previamente había sido equilibrada con 8 volúmenes de tampón de columna por cada litro de cultivo. Posteriormente, se transfirió la resina a una columna donde se lavó extensivamente con 12 volúmenes de columna con un flujo máximo de 1 ml/min. Las proteínas específicamente unidas se eluyeron con 1,5 volúmenes de columna de buffer de columna incluyendo maltosa 10mM en fracciones de 1/5 del volumen de la columna. Las fracciones que contenían mayor concentración de proteína se juntaron para llevar a cabo un segundo paso de purificación por cromatografía de intercambio iónico (secc. 2.2.9).

Para la purificación de His-MBP-CP, se puede proceder como en el paso anterior y continuar con este paso o viceversa, llevando así a cabo una purificación en tándem mediante las dos etiquetas de afinidad. Las bacterias precipitadas se resuspendieron en medio de lisis (tampón fosfato 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, Triton X-100 1%, β -mercaptoetanol 10 mM, glicerol 10% e inhibidores de proteasas sin EDTA (Complete mini EDTA-free, Roche)) en las mismas proporciones y se lisaron y clarearon de la misma manera. El extracto crudo clareado (o la elución con maltosa de la cromatografía mediante amilosa) se pasó por una columna HiTrap Chelating HP (GE Healthcare) quelada con Ni^{2+} (2 volúmenes de NiSO_4 0,1M) y equilibrada con el medio de lisis. El flujo de la columna se fijó a 1 ml/min. La columna se lavó con 10 volúmenes de medio de lisis con imidazol 10 mM y con 10 volúmenes de medio de lisis imidazol 20 mM. Finalmente, se eluyó la columna con un flujo de 0,2 ml/min con 1-3 volúmenes de medio de lisis con imidazol 0,3 M recogiendo fracciones de 0,2 ml. Las fracciones con mayor cantidad de proteína se dializaron con tripas 12-14 kDa de poro (Spectra/Por, Spectrum, Rancho Domínguez, CA, EE.UU.) frente a tampón RLN (NaHPO_4 - Na_2PO_4 50 mM pH 7,4, NaCl 140 mM, MgCl_2 1,5 mM, DTT 1mM) con glicerol 10% a 4°C durante 8h. La muestra dializada se cuantificó mediante reactivo de Bradford y por comparación con BSA con tinción por Coomassie en SDS-PAGE, se alicuoteó y se conservó a -80°C.

2.2.8. Cromatografía de exclusión molecular

Se empaquetaron 6,3 ml de lecho de sephacryl S-200 en una columna tras pasar 10 volúmenes de columna del tampón RLN (secc. 2.2.7) a un flujo de 10 ml/h. Las muestras se diluyeron en tampón RLN (secc. 2.2.7) con glicerol 5%, azul dextrano 0,1% y rojo fenol 0,1% y se cargaron directamente sobre el lecho (en mojado). La cromatografía se realizó al mismo flujo y se recogieron 9 fracciones de 0,5 ml por cada muestra separada, considerando que la fracción 2 es la primera en la que sale el azul dextrano y la 9 la última del rojo fenol. A cada fracción se le añadieron 2 ml de líquido de centelleo (HiSafe, GE Healthcare) y se contó la emisión cerenkov en un contador.

2.2.9. Cromatografía de intercambio iónico

El eluido de la columna de amilosa se dializó frente a tampón de unión (NaHPO_4 - Na_2PO_4 10 mM pH 7,0) y se pasó por una columna de heparina (HiTrap Heparin, GE Healthcare) previamente equilibrada con 10 volúmenes de tampón de unión a un flujo de 1 ml/min. A continuación se lavó con 5 volúmenes de tampón de unión y con 5 volúmenes de tampón de unión más NaCl 10mM. La elución se realizó pasando un gradiente lineal salino de NaCl 10 mM-1,5 M y se recogieron fracciones de 1/5 del volumen de la columna. Tras analizar el contenido de las fracciones, se juntaron las que contenían mayor cantidad de proteína y se dializó y se conservó la muestra como se ha indicado (secc. 2.2.7).

2.2.10. Identificación de proteínas por espectrometría de masas

La secuenciación de proteínas se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) y del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), ambos en Madrid. En el primer caso se les envió la banda de gel recortada por nosotros y en el segundo se les llevó el gel entero para que ellos la recortaran.

Digestión de proteínas en gel. Las manchas de proteína fueron escindidas manualmente y digeridas de forma automática en un robot digestor Proteineer DP (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemania). Se empleó un protocolo de digestión descrito (Shevchenko y cols., 1996) con ligeras variaciones: los fragmentos fueron reducidos con ditiotritol (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) 10 mM en

bicarbonato amónico (pureza: 99,5%; Sigma Chemical, St. Louis, MO, EE.UU.) 50 mM y alquilados con yodoacetamida (Sigma Chemical) 55 mM en bicarbonato amónico 50 mM. Los fragmentos de gel se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM y acetonitrilo (calidad HPLC; Merck, Darmstadt, Alemania) y fueron secados en corriente de nitrógeno. A continuación se añadió a los fragmentos del gel tripsina porcina modificada (calidad secuenciación; Promega) a una concentración de 13 ng/μl en bicarbonato amónico 50 mM y se dejó transcurrir la digestión durante 6 h. Por último, se añadió ácido trifluoroacético (pureza: 99,5%; Sigma Chemical) al 0,5% para extraer péptidos.

MALDI-MS(/MS) y búsqueda en bases de datos. Se mezcló una alícuota del digerido arriba indicado con una alícuota de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (Bruker-Daltonics) en acetonitrilo acuoso al 33% y 0,1% de ácido trifluoroacético. La mezcla se depositó en un porta muestras MALDI AnchorChip de 600 μm (Bruker-Daltonics) y se dejó secar a temperatura ambiente. Los datos de MALDI-MS(/MS) se obtuvieron en un espectrómetro de masas MALDI Ultraflex (Bruker-Daltonics) equipado con un dispositivo LIFT-MS/MS. Los espectros de masas se midieron en modo positivo, a una frecuencia de láser de 50 Hz, y se acumularon entre 100 y 1500 espectros individuales. Para el análisis de iones fragmento en modo tiempo de vuelo en tándem (TOF/TOF), los precursores fueron acelerados a 8 kV y seleccionados mediante una compuerta iónica temporal. Los iones fragmento generados mediante descomposición inducida por láser del precursor fueron de nuevo acelerados a 19 kV en la cámara LIFT y analizados en el reflector de iones. Las medidas se realizaron en parte utilizando supresión de iones metaestables post-LIFT, lo cual permitió la eliminación de señales de iones precursores y metaestables generados tras la extracción de la segunda fuente de iones. El análisis detallado de los datos de masas se llevó a cabo con el software flexAnalysis (Bruker-Daltonics). Los espectros MALDI-TOF fueron calibrados internamente empleando como referencia señales de masa de dos iones provenientes de la autólisis de la tripsina con $m/z = 842,510$ y $m/z = 2211,105$; la calibración para las medidas MALDI-MS/MS se realizó con los espectros de los iones fragmento de las señales protonadas de una mezcla de péptidos que cubría el intervalo $m/z = 800-3200$. Los datos de MALDI-MS y MS/MS fueron combinados mediante el programa BioTools (Bruker-Daltonics) para buscar en la base de datos NCBI nr empleando el software Mascot (Matrix Science, Londres, Reino Unido).

2.3. Ensayos *in vitro* de síntesis e interacción de macromoléculas

2.3.1. Transcripción *in vitro* y producción de ribosondas.

Para los experimentos de purificación de las proteínas de unión a RNA, el RNA se transcribió *in vitro* usando el kit MEGAscript (Ambion, Austin, TX, EE.UU.) usando 2 pmol de molde (producto de PCR) o 1 µg de plásmido linearizado durante 6,5 h (hUTR y hUTR-MS2) ó 2h (resto) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA se purificó por fenolización y precipitación con LiCl, o directamente por precipitación con LiCl. Para la síntesis de RNA para usarlo posteriormente en ensayos de traducción *in vitro* (secc. 2.3.2) se incluyó análogo de cap (Ambion) en la transcripción a una concentración de 6 mM. Para la producción de sondas para los experimentos de interacción *in vitro* RNA-proteína (secc. 2.3.4), los mismos moldes se transcribieron durante 20 min a 37°C con 0,5 U/µl de T7 RNA pol (Roche), 20 µCi de α[³²P]-UTP (secc. 1.7), 5 µM de UTP, 0,5 mM de los otros ribonucleótidos y 1 U/µl de inhibidor de RNasa (Roche). A continuación, se digirió el molde mediante la incubación con DNasa I (libre de actividad RNasa, Stratagene) 0,5 U/µl durante 30 min a 37°C. El RNA se purificó por fenolización y se separó de los ribonucleótidos no incorporados por cromatografía de exclusión molecular en sepharosa G-50 (G-50 microspin column, GE Healthcare). La actividad de la sonda se cuantificó por conteo cerenkov de una alícuota antes y después de pasar por la columna.

2.3.2. Traducción *in vitro*

Los ensayos de traducción *in vitro* se realizaron mediante la adición de un lisado de reticulocitos de conejo que contiene la maquinaria y los factores necesarios para la traducción de un RNA añadido (GE Healthcare). Para cada ensayo se emplearon 100 ng del mRNA transcrito *in vitro* en presencia de análogo de cap (secc. 2.3.1), 40 µCi de [³⁵S]-metionina y añadiendo KCl y acetato de magnesio para tener una concentración final de potasio y magnesio de 75 y 0,5 mM, respectivamente, en un volumen final de 25 µl. La mezcla se incubó 1 h a 30°C y los productos sintetizados se resolvieron por SDS-PAGE (secc. 2.2.3) y el gel se sometió posteriormente a fijación (secc. 2.2.4) y fluorografía (secc. 2.2.6).

2.3.3. Síntesis *in vitro* de proteínas en un sistema eucariótico de transcripción-traducción acopladas

La síntesis de proteínas se realizó también en un sistema de lisado de reticulocitos mejorado que incluye inhibidor de RNasa, la T7 o la SP6 RNA pol, nucleótidos y la concentración de sales ajustada (TnT system, Promega). Las reacciones se ensamblaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de ORFs bajo el promotor de T7 (HuR, G3BP y NPM) se utilizó como molde productos de PCR (ver secc. 2.1.3.5) y el reactivo de la casa comercial T7 PCR enhancer, y para la de ORFs bajo el promotor de SP6 (IMP1 y PK), el plásmido sin digerir. En ambos casos se añadieron 0,5 µg de molde. Además, se añadió metionina a una concentración final de 20 µM o 0,4 µCi/µl de [³⁵S]-metionina para la síntesis de proteína sin marcar (fría) y marcada, respectivamente. El grado de síntesis de proteína se determinó mediante la valoración de la incorporación de [³⁵S]-metionina en proteína precipitada con acetona y por SDS-PAGE y fluorografía de una pequeña alícuota (1/50 parte).

2.3.4. Ensayos *in vitro* de interacción RNA-proteína

Los ensayos de interacción *in vitro* RNA-proteína se llevaron a cabo con objeto de mimetizar a pequeña escala las condiciones del ensayo de purificación de RNA-BPs. Las cantidades indicadas de proteína de un extracto de proteico o de proteína recombinante se incubaron con 75.000 cpms de las sondas (secc. 2.3.1) indicadas en cada caso en tampón RLN y en presencia de 0,5 µg/µl de tRNA de *S. cerevisiae* o de DNA de esperma de salmón (secc. 2.2.7) 1h a 4°C, excepto cuando se indica específicamente el tiempo de incubación. Dependiendo del objetivo del experimento, los complejos que se formaron durante la incubación se separaron de la sonda libre mediante tres métodos. (i) Los experimentos en que se incubaba la proteína recombinante His-MBP-CP con hUTR-MS2 marcado, los complejos se capturan directamente mediante la resina de amilosa incubando durante los tiempos indicados (Fig. 17B). (ii) En los experimentos para titular la estequiometría de la reacción de unión entre las proteínas del extracto celular (Fig. 18B) o la His-MBP-CP (Fig. 17A) con el hRNA la separación de los complejos y la sonda libre se realiza mediante EF en condiciones nativas (EMSA, secc. 2.2.3). (iii) En los experimentos en los que el objetivo era identificar el peso molecular de las proteínas que interaccionan directamente con las distintas sondas (Figs. 18A y 22B), tras la incubación se irradiaron las muestras con luz ultravioleta ($\lambda=254$ nm) en un Stratalinker 1800 (Stratagene) durante 6 min para inducir el entrecruzamiento covalente RNA-proteína (UVXL) y se digirió el RNA no asociado a proteínas con

0,5 U/μl de RNAsa T1 durante 30 min a 37°C. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE (secc. 2.2.3). Tras la EF los geles (EMSA y UVXL) se secaron al vacío y con calor y se expusieron sobre películas autorradiográficas a -70°C.

2.3.5. Purificación de proteínas de unión a RNA (RNA-BPs) a partir de extractos celulares

En primer lugar se saturó la resina de Ni²⁺ o de amilosa incubando un exceso molar de His-MBP-CP 8h a 4°C en solución de unión, que contiene tampón RLN (secc. 2.2.7) con 1 μg/μl de DNA espermatozoide de salmón y una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (Complete mini EDTA-free, Roche). A continuación, la resina se lavó 3 veces con solución de unión y 2 veces con RLN durante 10 min en la noria a 4°C y con 10 volúmenes de columna. Como la capacidad de la resina puede variar con el tiempo y de un lote a otro, la cantidad de proteína adsorbida se determinó empíricamente cuantificando la proteína y analizando por SDS-PAGE la elución de una alícuota de estas muestras. La resina saturada de proteína se guardó a 4°C en tampón RLN más NaN₃ 0,01% hasta un mes. Antes de cada experimento, se incubó 1 nmol de His-MBP-CP inmovilizada en la resina con 0,1 nmol de hRNA puro en solución de unión con una relación resina/solución 1/10. La unión del hRNA a la proteína inmovilizada en la resina se valoró mediante la inclusión de una traza de hRNA marcado con [³²P] y el conteo del sobrenadante (Fig. 17B). La resina con la proteína y el hRNA adsorbidos se lavó 3 veces durante 10 min con 10 volúmenes de solución de unión en la noria a 4°C. Después, se incubó con el extracto de proteínas (12-16 mg de proteína correspondientes a dos placas de cultivo de 150 mm) 2h a 4°C en la noria. A continuación, se lavó la resina durante 10 min con 50 volúmenes de RLN cinco veces a 4°C en la noria en columnas PD-10 (GE Healthcare). La elución de las proteínas asociadas al hRNA se llevó a cabo en dos pasos sucesivos. Primero se incubó la resina con RNAsa A 20 μg/ml en tampón RLN con agitación suave durante 30 min a 37°C. En segundo lugar se eluyó con maltosa 0,1 M o con imidazol 0,5 M durante 10 min a temperatura ambiente. La eficiencia de elución se valoró mediante una tercera elución con hidrocloruro de guanidina. Las fracciones de las sucesivas eluciones se recogieron inmediatamente y las proteínas se precipitaron añadiendo 5 volúmenes de acetona dejándolas por lo menos 8h a -20°C. Las muestras precipitadas se centrifugaron 10 min a 12.000 g, se lavó el precipitado con acetona, se recentrifugó, se dejó secar el precipitado y resuspendió en tampón de carga de EF durante 10 min a 95°C.

2.4. Biología celular

2.4.1. Mantenimiento de líneas celulares establecidas en cultivo

Las líneas celulares HepG2 y HEK 293 se **cultivaron** en DMEM suplementado al 10% con suero bovino fetal y la línea celular NRK en el mismo medio suplementado al 5%. Todos los medios fueron complementados con 2 mM glutamina, 100 UI/ml penicilina, 0,1 mg/ml estreptomicina y 400 μ M de aminoácidos no esenciales (Ala, Asn, Asp, Glu y Pro). Todas las líneas celulares se mantuvieron en incubadores a 37°C con 7% CO₂ y un 95% de humedad. Para la **conservación** de las líneas se congelaron de forma gradual (14h a -20°C y 24h a -70°C antes de ser conservadas en N₂ líquido) alícuotas de 5 millones de células con no más de 3 pases acumulados en 1ml del medio de cultivo con DMSO al 10%. La **descongelación** de estos viales se realizó a 37°C diluyéndolas inmediatamente en medio de cultivo y centrifugándolas antes de ponerlas a crecer en una placa de 60 mm y un frasco de 25 cm².

Los experimentos se llevaron a cabo en células que no acumulaban más de 25 **pases** ni presentaban **contaminación por *Mycoplasma sp.*** Los tests de detección de contaminación de *Mycoplasma* se realizaron mediante el kit Venor GeM (Minerva Biolabs, Berlin, Alemania) de forma periódica en alícuotas de medio de cultivo de células crecidas durante 60 h. Además, de cada línea celular se mantuvo en paralelo un frasco 25 cm² con tapón con filtro (0.2 μ m vented cap T-25 Flask; Corning, Corning, NY, EE.UU.) para el cultivo de células en medio de cultivo suplementado con ciprofloxacino a una concentración de 10 μ g/ml. Este cultivo se pasaba de forma independiente a los demás con medios específicos.

2.4.2. Extracción de DNA genómico, RNA y proteína de cultivos celulares

Las células se lavaron dos veces con PBS y se despegaron de la placa mediante rascado o por tratamiento con una solución 0,25% Tripsina-0,02% EDTA, retirando inmediatamente esta solución y dejando la placa 3 min en el incubador. Posteriormente, se añadió PBS para recoger las células obteniendo una suspensión de células que se centrifugó a 500 g durante 5 min y a 4°C. A continuación, el sedimento de células obtenido se resuspendió en 100 μ l del solución de lisis (RLN más Tritón X-100 al 0,5% e inhibidores de proteasas) por cada 4 millones de células y se mantuvieron en hielo durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron durante 10 min a 15.000 g a 4°C. El sobrenadante se usó para

Material y métodos

el análisis de proteínas como para extraer RNA citoplasmático con el kit RNeasy (QIAGEN). La extracción de DNA genómico se llevó a cabo con el kit DNeasy (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4.3. Fraccionamiento subcelular por ultra-centrifugación en gradiente de densidad

Se resuspendieron 25 millones de células en 0,5 ml de solución hipotónica (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 10 mM e inhibidores de proteasas) y se incubó durante 10 min en hielo. Transcurrido este tiempo, se rompieron las células mecánicamente con un potter vidrio-teflon y la lisis celular se valoró por tinción con la sonda vital azul de tripano. A continuación, se completó hasta 1 ml obteniendo una solución de gradiente con la siguiente composición: Tris-HCl 30 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 5mM, DTT 5mM, sacarosa 0,2M, heparina 0,5 mg/ml, cicloheximida 0,15 mg/ml, se dejó incubar otros 10 min en hielo y se centrifugó 10 min a 500 g para precipitar los núcleos y las células no lisadas.

Los extractos de hígado fetal de rata se realizaron troceando los hígados de cinco fetos, homogenizándolos 1/4 (p/v) en medio A (sacarosa 0,25M, Tris-HCl 10 mM pH 7,4, EGTA 1 mM e inhibidores de proteasas) y centrifugando el homogenado a 800 g durante 10 min a 4°C.

Los extractos post-nucleares preparados como se acaba de indicar se depositaron sobre un gradiente lineal de sacarosa 15-45% o del 24 al 54% en solución de gradiente y se ultra-centrifugó a 38.000 rpm en el rotor SW40Ti durante 2,5h y sin freno. El gradiente se separó en fracciones de 1 ml que se dividieron en 200 μ l para extraer proteína mediante precipitación con acetona (secc. 2.3.5) y 800 μ l, a los que se añadió inmediatamente 100 μ l de SDS 10% y 20 μ l de EDTA 0,5 M, se mezcló bien y se añadió 1 ml de reactivo Tri Pure (Roche) para la extracción de RNA.

2.4.4. Transfección de plásmidos

Para la transfección de plásmidos en células eucarióticas se utilizaron preparaciones de alto grado de pureza (secc. 2.1.1) y filtrados (0,2 μ m, Millipore, Billerica, MA, EE.UU.). En estos experimentos se utilizaron los reactivos Plus y Lipofectamina

(Invitrogen) y Jet Pei (Polyplus Transfection, Illkirch, Francia), siguiendo las instrucciones del fabricante y manteniendo una relación N/P = 5 en todos los puntos. De forma rutinaria, se mantuvo el medio de cultivo con los complejos liposoma catiónico-DNA en contacto con las células durante dos horas, se cambió el medio y se analizó el fenotipo 18 - 60 h post-transfección.

2.4.5. Generación de líneas celulares establemente transfectadas

La selección de células positivas se llevó a cabo 24 horas después de la transfección con 200 µg/ml de geneticina (G418, GIBCO, Invitrogen). En el momento de empezar el tratamiento se pasaron las células a una placa más grande (35 mm → 100 mm) y se diluyeron 1/5. Las células se mantuvieron en estas condiciones durante varios días, cambiando el medio y reponiendo la geneticina cada dos días. Los clones positivos así obtenidos fueron sub-clonados con anillos de clonaje (8x8 mm) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) a placas de 12 pocillos, se analizaron por RT-PCR (Fig. 30B) y los clones positivos se expandieron y se analizaron por PCR a partir de DNA genómico.

2.4.6. Citometría de flujo

Una suspensión en PBS de células tripsinizadas (secc. 2.4.2) se centrifugaron 5 min a 500 g a 4°C y el precipitado se resuspendió en solución de FACS (FBS 1%, NaN₃ 0, 1 % y PBS 1X). La suspensión celular se analizó en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU.) utilizando el programa CellQuest suministrado por el fabricante. En cada condición se analizaron al menos 20.000 células. Los resultados se analizaron con el programa FloJo para Mac.

2.4.7. Microscopía de fluorescencia

Células NRK y C4 creciendo activamente fueron teñidas con 5 µg/ml Hoescht 33342 (Molecular Probes, Invitrogen) en medio de cultivo durante 10 minutos a 37°C y protegidas de la luz. A continuación, la expresión de GFP y la tinción de ácidos nucleicos fueron observadas directamente en las placas de cultivo en un microscopio de fluorescencia Leica DM IRB (Leica microsystems, Wetzlar, Alemania) equipado con tres filtros (verde, rojo y triple). En ocasiones, se sembraron las células NRK y C4 en cubreobjetos estériles previamente cubiertos 12h con poli-lisina y se transfectaron a las 24h con pGFP-CP, o se transfectaron en placa,

se tripsinizaron y se sembraron sobre cubreobjetos tratados con poli-lisina. Las células se fijaron con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% (Merck) en PBS y se conservaron en PBS 0,02% NaN_3 a 4°C.

2.4.8. Inmunomicroscopía electrónica

Criosustitución e inclusión en Lowicryl. Las muestras de tejido de hígado se fijaron mediante inmersión de pequeños trozos ($\sim 1\text{mm}^3$) en 4% de paraformaldehído (Merck) en tampón fosfato Sörensen 0,1 M pH 7,2 suplementado con 6% sacarosa durante 2 horas a 4°C, siendo conservados hasta su inclusión en 0,1% paraformaldehído en tampón fosfato 0,1M pH 7,2 y 6% sacarosa, a 4°C (Egea y cols., 1997). Posteriormente, se deshidrataron a temperaturas descendentes en concentraciones crecientes de metanol. Las líneas celulares se fijaron siguiendo el mismo protocolo usado para el tejido de hígado y posteriormente fueron crioprotegidas utilizando concentraciones crecientes (0,1-2,3 M) de sacarosa. A continuación se criofijaron en N_2 (l) y se criosustituyeron en metanol a -80°C. Todas las muestras se embebieron en Lowicryl K4M (Chemische Wercke Lowi, Waldkraiburg, Alemania) según el protocolo descrito por la casa comercial.

Obtención de criosecciones ultrafinas. Las células se fijaron en 4% de paraformaldehído más 0,1% de glutaraldehído en tampón fosfato 0,1M pH 7,4 durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las células se incluyeron en gelatina al 2% durante 2 horas en hielo y se hicieron cuadrados de aproximadamente $0,5\text{ mm}^3$. Las muestras fueron crioprotegidas durante toda la noche a 4°C en sacarosa 2,3 M. Una vez criofijadas en N_2 (l), se obtubieron criosecciones ultrafinas, de 70-80 nm de espesor, a -120°C en ultramicrotomo LeicaUCT (Leica microsystems). Los cortes se recogen con un loop en metilcelulosa 2% en agua:sacarosa 2,3M (1:1).

Inmunomarcaje. El inmunomarcaje se llevó a cabo sobre cortes en rejillas de cada una de las muestras con el siguiente protocolo: tras bloquear con 1% BSA en PBS durante 5 min, se incubó con el primer anticuerpo diluido en medio de bloqueo durante 1h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente, se incubó durante 1h con 0,08 U de A_{525} nm del complejo proteína A-oro coloidal de menor tamaño (10 nm) diluido en PBS suplementado con 1% BSA, 0,075% Tritón X-100, 0,075% Tween 20 y 0,02% NaN_3 durante 45 min a temperatura ambiente

en cámara húmeda. Tras lavar el exceso de anticuerpo se incubó 30 min con 0,1 mg/ml de proteína A en PBS para saturar los sitios de unión del primer anticuerpo a la proteína A. Por último, las muestras se fijaron con 1% glutaraldehído en PBS y se contrastó 7 min con acetato de uranilo y 45 s con citrato de plomo. En paralelo se realizaron una serie de controles clásicos para comprobar la especificidad de la señal inmunoreactiva. Las muestras se observaron en un microscopio JEOL 1010 (Tokio, Japón) a 80 KV. Los anticuerpos utilizados están indicados en la Tabla MM2. Las técnicas de inclusión, corte, procesamiento y fotografiado de las muestras analizadas por inmunomicroscopía electrónica fueron realizadas por el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”.

2.4.9. Medida del flujo glucolítico

Se midió el flujo glucolítico en células, transfectadas o no transfectadas, al 70% de confluencia en placas de 35 mm con 2 ml de medio de cultivo fresco. En algunos experimentos se realizó un tratamiento con oligomicina 6 μ M. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 100 μ l del medio. Las muestras recogidas se precipitaron con 4 volúmenes de ácido perclórico 6% durante al menos 30 minutos en hielo y, después de centrifugar a 5 min a 11.000 g 4°C, los sobrenadantes se neutralizaron y se usaron para la determinación enzimática del lactato (Cuezva y cols., 1982).

2.4.10. Medida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)

Para la determinación del potencial de membrana mitocondrial se utilizó TMRM, tetra-metil-rodamina-metil-éster (Molecular Probes, Invitrogene) a una concentración final de 0,5 μ M. Las células sometidas a distintos tratamientos se lavaron dos veces con PBS y se despegaron de la placa mediante tripsinización. El sedimento celular se lavó con PBS. A continuación, se resuspendieron aproximadamente 500.000 células de cada condición en 300 μ l de PBS con la sonda a una concentración de 0,5 μ M y se incubó durante 30 min a 37°C en oscuridad. Asimismo, se analizó una alícuota de células incubadas en paralelo en ausencia de sonda para estudiar la morfología y el tamaño celular. Las células incubadas con las distintas sondas se analizaron en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson) utilizando el programa CellQuest suministrado por el fabricante. En cada condición se analizaron al menos 10.000 células.

2.4.11. Marcaje metabólico de proteínas en células en cultivo

Células transfectadas o no transfectadas al 70 % de confluencia se incubaron 20 min en medio de cultivo sin metionina ni cisteína. Tras esta incubación se reemplaza con medio de marcaje (medio de cultivo sin metionina ni cisteína y 0,14 mCi/ml de Promix (secc. 1.7) y se deja incubar 30 min.

2.4.12. Velocidad de síntesis de proteínas *in vivo*

Tras realizar un marcaje metabólico de corta duración (dependerá de la vida media de la proteína a estudiar) de las proteínas (secc. 2.4.11), se lavaron inmediatamente las células con PBS frío, se tripsinizaron y se lisaron (secc. 2.4.2). Rutinariamente, se usó una placa de 35 mm por cada punto. Se determinó la cantidad de proteína de los extractos (secc. 2.2.2) y la incorporación de [³⁵S]-metionina. Para calcular la incorporación de aminoácidos marcados sobre el conjunto de proteína celular, cada muestra se precipitó con ácido tri-cloro-acético y se contó la radiactividad presente exclusivamente el precipitado de proteínas. Brevemente, a 1 µl de extracto se le añadieron 20 µl de SDS 0,5%, 50 µl de BSA 2 mg/ml y 2 ml de TCA 15% más metionina 1 mM y se dejaron precipitar las proteínas 1h en hielo. La mezcla se pasó a través de filtros GF/C que se lavaron con TCA al 5%, se secaron con etanol y se sumergieron en líquido de centelleo (Hi Safell, GE Healthcare) antes de realizar el contaje. Para analizar la cantidad de proteína sintetizada durante el periodo de marcaje se procedió a la inmunoprecipitación de la proteína de interés partiendo de unos 100 µg de proteína total y unas 3 10⁶ cpms por cada punto (secc. 2.4.13).

2.4.13. Inmunoprecipitación (IP)

En primer lugar se realizó el recubrimiento de resina de proteína A o proteína G sepharosa (Sigma Aldrich) con el anticuerpo. Para ello, se incubaron 50 µl de resina, hinchada y equilibrada, con 750 µl de solución de anticuerpo 0,02 µg/µl (BSA 5 mg/ml, inhibidores de proteasas en tampón RIPA (Tris-HCl 50mM pH 7,4, NaCl 150mM, NP40 1%, desoxicolato sódico 0,25%, SDS 0,1%)) durante 8h a 4°C. Posteriormente se lavó la resina 2 veces con 10 volúmenes de solución de anticuerpo y 3 veces con RIPA. La resina con el anticuerpo inmovilizado se conservó a 4°C hasta 15 días a 4°C en RIPA con NaN₃ 0,02%.

Los extractos celulares se diluyeron en RIPA y se les añadió 5 µl de resina cubierta de anticuerpo (~ 1,5 µg de anticuerpo en 50 µl de suspensión 1/10) hasta un volumen final de 300 µl y se les dejó incubar 1h a 4°C en la noria. Posteriormente, se lavó la resina 5 veces con 1 ml de RIPA sin apurar el precipitado y, finalmente, una vez con RLN NaCl 10 mM dejando seca la resina. La resina se eluyó con tampón de carga de EF (Sambrook y Russell, 2001) 10 min a 95°C con agitación, se centrifugó a 12.000 g y analizamos el sobrenadante por EF.

2.4.14. Análisis de interacción RNA-proteína *in vivo* (RIP)

Se tripsinizaron $\sim 10^7$ células (secc. 2.4.2) y se resuspendió el precipitado de células en HCHO 1% en PBS y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente en la noria para inducir el entrecruzamiento químico. La reacción se paró añadiendo glicina hasta una concentración final de 0,25 M y se dejó incubar 5 min a temperatura ambiente y en la noria. Las células se centrifugaron, lavaron con PBS frío, se lisaron en 1 ml de RIPA durante 10 min en hielo y se sonicaron brevemente. A continuación, se centrifugó 15 min a 12.000 g y el sobrenadante se juntó con 200 µl de suspensión 1/10 de Proteína A/G sepharosa cubierta de anticuerpo (equivalente a unos 6 µg de anticuerpo) para proceder con el protocolo de IP (secc. 2.4.13). Los inmunoprecipitados se lavaron con 3 veces con RIPA más Urea 1M y EDTA 1mM, 3 veces con RIPA y una vez con tampón RLN con NaCl 10 mM. La elución de los inmunoprecipitados y la reversión del entrecruzamiento químico se realizaron de forma simultánea incubando los inmunoprecipitados con una solución que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 5 mM, DTT 10 mM y SDS 1% durante 20 min a 70°C con agitación intensa. El RNA de los inmunoprecipitados se extrajo (secc. 2.4.2) usando glucógeno (Glycoblue, Ambion) para facilitar la precipitación.

2.4.15. Localización de RNA *in vivo*

Se transfectaron células de forma transitoria con β -mRNA-MS2, β -galactosidasa-MS2 o β -galactosidasa-MS2-3' β junto a un plásmido que expresa la proteína de fusión GFP-CP-nls (que expresa GFP fusionada a la proteína de unión a MS2 en el núcleo) en una relación 20:1. Las células se observaron entre 18 y 72h post-transfección. Por otro lado, se transfectó la línea celular C4, que expresa de forma estable β -mRNA-MS2 con CP-GFP y se procedió de la misma manera.

RESULTADOS

1. Fenotipo bioenergético en tumores humanos.

Actualmente, uno de los principales retos en la investigación del cáncer es encontrar marcadores moleculares que permitan un análisis sencillo y fiable para el diagnóstico temprano y seguimiento de la enfermedad. Recientemente, hemos publicado diversos trabajos en los que demostramos que la alteración del fenotipo bioenergético celular es un rasgo característico de la mayoría de los tumores (Cuezva y cols., 2002; Isidoro y cols., 2004) y constituye además una herramienta para el pronóstico de pacientes con tumores de colon (Cuezva y cols., 2002), pulmón (Cuezva y cols., 2004; Lopez-Rios y cols., 2007) y mama (Isidoro y cols., 2005). Esta alteración se valora a través de la medida de los niveles de expresión de un marcador de la fosforilación oxidativa (β -F1-ATPasa), un marcador estructural de la mitocondria (Hsp60) y marcadores de la vía glucolítica (gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, GAPDH y piruvato quinasa M, PK). Con estos datos se genera una firma proteómica que da una idea sobre el metabolismo energético de la célula (Cuezva y cols., 2002). Debido a que hemos encontrado que existe un patrón característico de expresión de estos marcadores en tumores humanos (distinto al del tejido normal) le hemos denominado la huella bioenergética del cáncer (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2004; Isidoro y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005; Lopez-Rios y cols., 2007).

1.1. Carcinomas basocelulares de piel (BCC).

Se ha estudiado la huella bioenergética de carcinoma basocelulares de piel (BCC) y del tejido normal adyacente procedentes de 8 pacientes. Hemos analizado los niveles de expresión de β -F1-ATPasa, Hsp60, GAPDH y PK en extractos de estas muestras por *Western blot* utilizando como referencia de carga de proteína a la α -tubulina (Fig. 1A). β -F1-ATPasa en los tumores presenta un descenso significativo de un 40% en su expresión cuando se compara con la del tejido normal, mientras que otra proteína mitocondrial, Hsp60, no muestra ningún cambio (Fig. 1B). GAPDH muestra un aumento, aunque no significativo, y no se observan variaciones en la expresión de PK (Fig. 1B). Debido a que Hsp60 es una proteína estructural de la mitocondria, la hemos utilizado para normalizar la expresión de β -F1 de tal manera que el cociente β -F1/Hsp60 nos da una idea sobre la actividad mitocondrial de las células. El valor de este cociente en el tejido tumoral es la mitad que en el tejido normal (Fig. 1B) lo que sugiere que la funcionalidad bioenergética de las mitocondrias está disminuida. Finalmente, el cociente β -F1/Hsp60 lo hemos dividido por el nivel de expresión de GAPDH. A este cociente lo hemos denominado

Resultados

Índice bioenergético celular (BEC-index). Las muestras de BCC muestran una disminución significativa de casi 4 veces del valor del índice BEC (Fig. 1B). Estos datos sugieren, del mismo modo que en otros tumores, que en este tipo de tumores las células presentan una funcionalidad mitocondrial reducida.

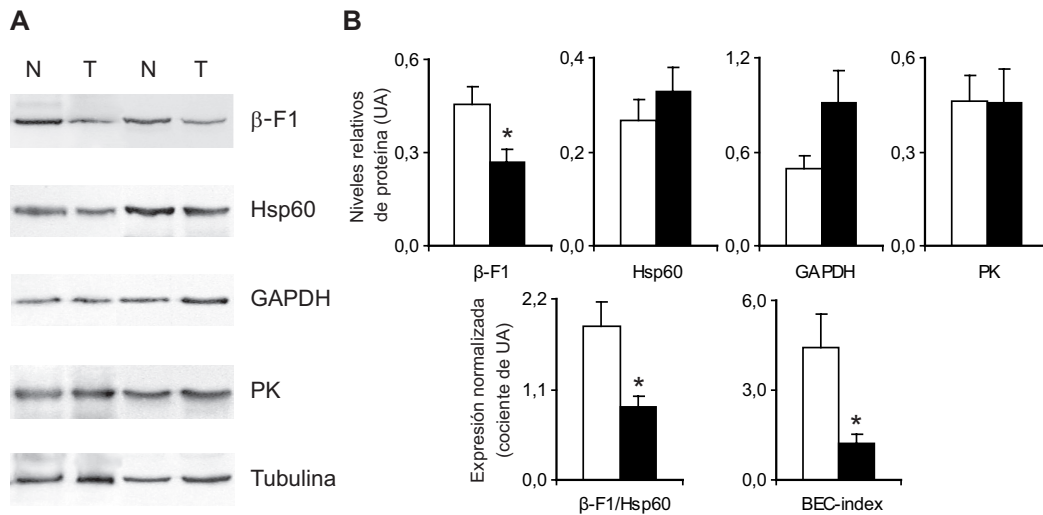


Figura 1: Análisis del fenotipo bioenergético celular en carcinoma basocelular de piel (BCC). **A**, Resultados de *western blot* representativos de muestras de BCC (T) y del tejido normal (N) de dos pacientes. Los anticuerpos contra proteínas mitocondriales (β -F1 y Hsp60), glucolíticas (GAPDH y PK) y celulares (Tubulina) que se han usado están señalados a la derecha de los paneles. **B**, En los histogramas superiores se muestra la cuantificación por densitometría de las bandas inmunorreactivas de las proteínas indicadas (normalizada respecto a una muestra control) en el tejido normal (barras blancas) y tumoral (barras negras). En los histogramas inferiores se muestra el cálculo de los cocientes que representan la actividad mitocondrial (β -F1/Hsp60) y la actividad mitocondrial relativa al potencial glucolítico (BEC-index, que es el cociente β -F1/Hsp60/GAPDH). Los resultados son la media \pm S.E.M. de 8 pacientes. * $P \leq 0,05$ cuando se comparan N frente a T usando la t de Student.

Dado que la expresión de β -F1-ATPasa está específicamente reprimida en tumores (de Heredia y cols., 2000) y que es un gen que en rata hemos demostrado que está sometido a un control post-transcripcional muy estricto (Luis y cols., 1993; Izquierdo y cols., 1995; Egea y cols., 1997; Izquierdo y Cuezva, 1997; Ricart y cols., 2002; Martinez-Diez y cols., 2006), hemos analizado los niveles de RNA de estos marcadores por *northern blot* en muestras tumorales y de tejido sano del mismo paciente de 8 enfermos con BCC (Fig. 2A). Los valores de expresión los hemos normalizado usando 7S como gen de referencia. La expresión de β -F1 está ligeramente aumentada en los tumores en ausencia de cambios en Hsp60, si bien este cambio no es significativo (Fig. 2B). Coherentemente con lo observado previamente (Fig.1), la expresión de GAPDH está aumentada en los tumores lo que sugiere que los cambios de expresión en GAPDH pueden ser consecuencia de una aumento en la tasa de transcripción del gen y/o un incremento de la estabilidad del mRNA en BCC.

Globalmente, los resultados sugieren que la reducción de la expresión de β -F1-ATPasa en BCC respecto al tejido normal puede ser imputado a mecanismos de control post-transcripcional de la expresión de este gen.

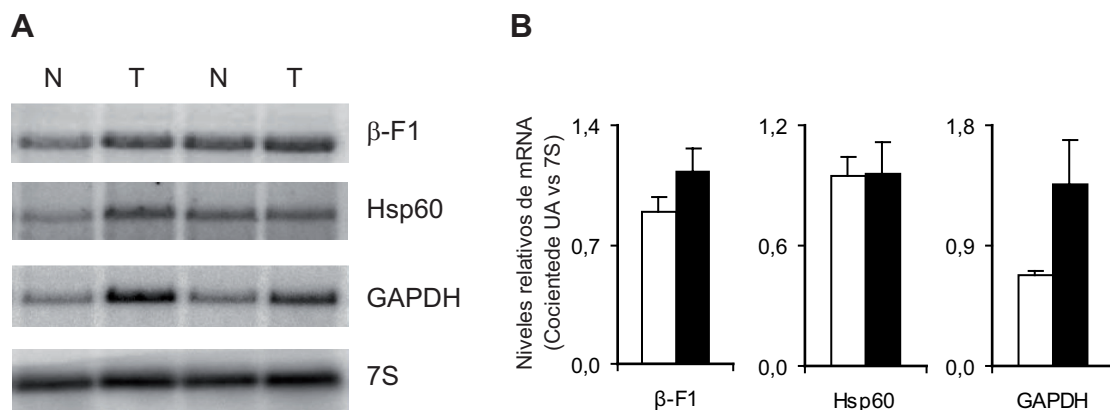


Figura 2: Análisis de los niveles de mRNA de los marcadores del fenotipo bioenergético celular en BCC. **A**, Resultados de *northern blot* representativos de muestras de BCC (T) y del tejido normal (N) de dos pacientes. Las sondas correspondientes a los genes mitocondriales (β -F1 y Hsp60), glucolíticos (GAPDH) y celulares (7S) se indican a la derecha de los paneles. **B**, Cuantificación por densitometría de las bandas de hibridación de los genes indicados (normalizada respecto a la densitometría de la banda de 7S en la misma muestra) en el tejido normal (barras blancas) y tumoral (barras negras). Los resultados son la media \pm S.E.M. de 8 (β -F1 y Hsp60) y 3 (GAPDH) pacientes.

1.2. Carcinomas de pulmón.

1.2.1. Adenocarcinomas (LAC) y carcinomas escamosos de pulmón (SLC).

A continuación hemos ampliado el estudio del fenotipo bioenergético a carcinomas de pulmón (de mayor relevancia clínica y social) para los que hemos contado con muestras procedentes de 9 pacientes con adenocarcinoma de pulmón (LAC, lung adenocarcinoma) y otros tantos con carcinoma escamoso de pulmón (SLC, squamous cell lung carcinoma). En la Figura 3 se muestran los resultados del análisis por *western blot* de la huella bioenergética del cáncer en los tumores y en muestras de tejido normal del mismo paciente. En ambos tipos de tumores se observa una disminución relativa de la capacidad mitocondrial valorado como el cociente β -F1/Hsp60 (Fig. 3B). Cabe resaltar la inducción de 2-3 veces de las proteínas mitocondriales (Hsp60 y COXIV) en LAC y la fuerte inducción de sólo Hsp60 (más de 5 veces) en SLC (Fig. 3B). Además, en ambos tipos de tumores se produce un aumento similar de los niveles de expresión de GAPDH de tal manera que el índice BEC presenta una reducción muy significativa de 10 veces en LAC y de hasta 20 veces en SLC (Fig. 3B). Por lo tanto, al igual que en el caso de los BCC, los resultados sugieren que en los carcinomas de pulmón se produce una reducción de la capacidad mitocondrial que va unida a un aumento del potencial

Resultados

glucolítico de las células. Hay que destacar además que el patrón de expresión de ciertos marcadores (Hsp60, COXIV, PK) así como el valor de los indicadores de la alteración del fenotipo bioenergético (β -F1/hsp60 y BEC) son distintos en los dos tipos histológicos estudiados (Fig. 3B), lo que sugiere su posible utilización para el diagnóstico diferencial de estas dos neoplasias.

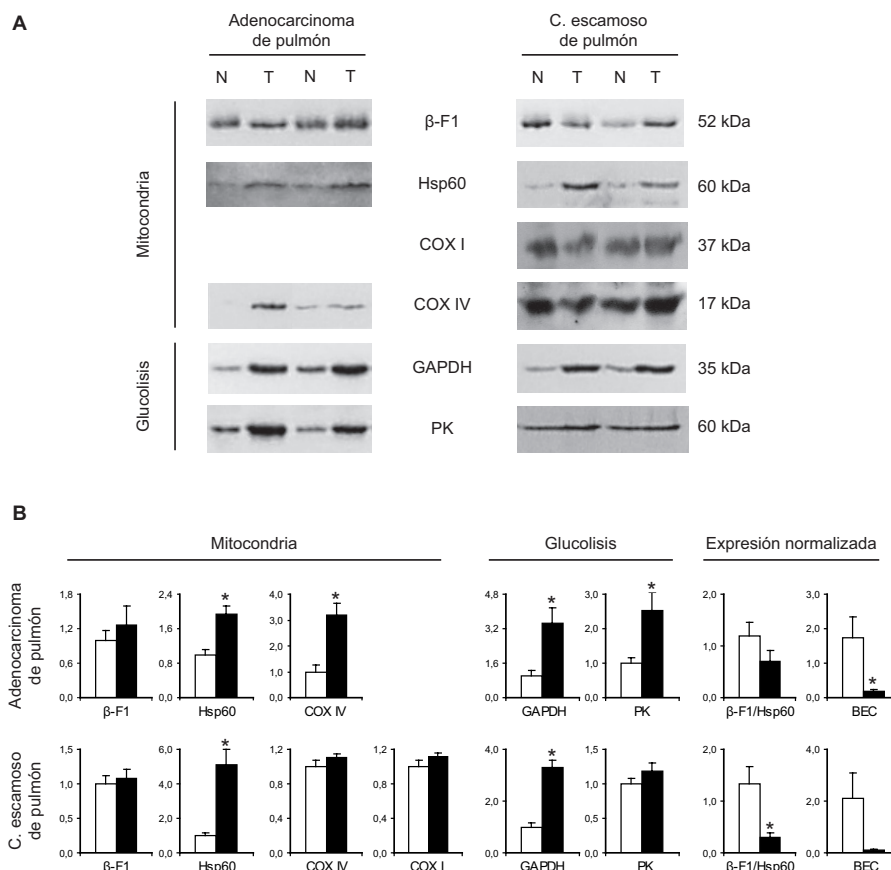


Figura 3: Análisis del fenotipo bioenergético celular en carcinomas de pulmón.

A, Resultados de *western blot* representativos de muestras de carcinoma escamoso o adenocarcinoma de pulmón (T) y del tejido normal (N) de dos pacientes. Los anticuerpos contra proteínas mitocondriales (β -F1, Hsp60, COX I y COX IV) y glucolíticas (GAPDH y PK-m) que se han usado están señalados. La movilidad electroforética relativa de las bandas inmunorreactivas en kDa está señalada a la derecha. **B**, En los histogramas (mitochondria y glucolisis) se muestra la cuantificación por densitometría de las bandas de las proteínas indicadas en el tejido normal (barras blancas) y tumoral (barras negras). Los histogramas correspondientes a la expresión normalizada muestran el cálculo de los cocientes que representan la actividad mitocondrial (β -F1/Hsp60) y la actividad mitocondrial relativa al potencial glucolítico (BEC, que es el cociente β -F1/Hsp60/GAPDH). Los resultados son la media \pm S.E.M. de 9 pacientes de cada tipo histológico de carcinoma. * $P \leq 0,05$ cuando se comparan N frente a T usando la t de

Por otro lado, hemos estudiado los niveles de expresión de los mRNAs que codifican los marcadores del fenotipo bioenergético en carcinomas de pulmón (Fig. 4). En este sentido, hay trabajos recientes en los que se ha analizado simultáneamente la expresión de miles de genes mediante técnicas de hibridación específica en chips de cDNA (cDNA microarrays) en muestras de LAC y de SLC comparándola con la de muestras de tejido normal (Bhattacharjee y cols., 2001). En la Figura

4 hemos resumido el análisis de la expresión de β -F1, Hsp60 y GAPDH a partir de los datos de los trabajos citados y recogidos en la base de datos ONCOMINE (Rhodes y cols., 2007). Los niveles estacionarios de mRNA de los tres genes están significativamente aumentados en ambos tipos de carcinomas respecto al tejido normal. Por tanto, si bien la inducción de Hsp60 y GAPDH (Fig. 4) explica la sobreexpresión de las proteínas observada en los carcinomas (Fig. 3), la expresión de la proteína β -F1-ATPasa (Fig. 3) no se correlaciona con los niveles elevados de β -mRNA en LAC y SLC (Fig. 4). Además, el análisis de la expresión de estos genes en muestras de tejido normal y tumoral de 3 pacientes mediante RT-qPCR nos ha confirmado que, aunque a distintos niveles (β : hasta 2,5 veces; Hsp60: hasta 6 veces; GAPDH: hasta 8 veces), existe una inducción reproducible de la expresión de estos tres genes en carcinomas de pulmón (Resultados no mostrados). Estos resultados sugieren la existencia de mecanismos específicos de represión de la traducción de β -mRNA en carcinomas de pulmón.

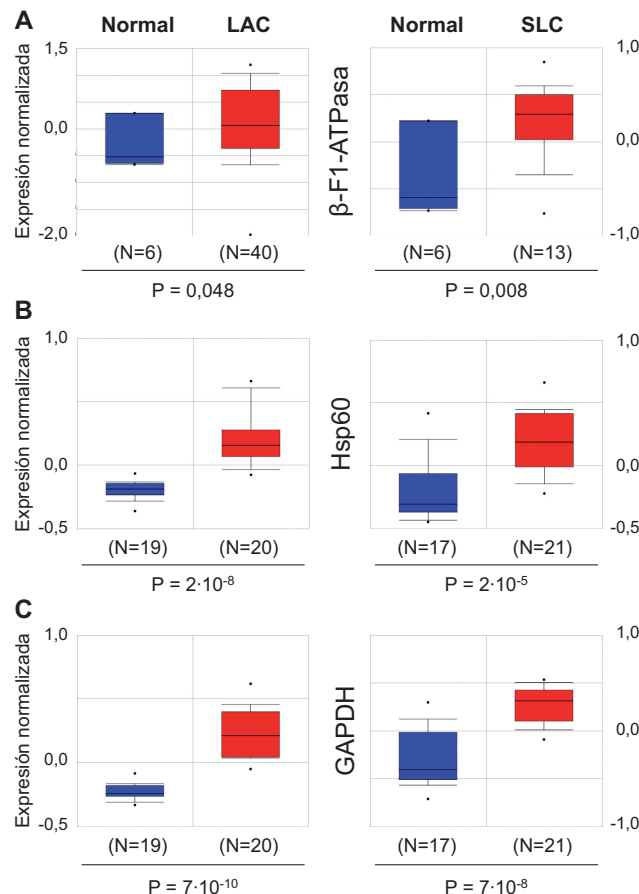


Figura 4: Niveles de mRNA de los marcadores del fenotipo bioenergético de carcinomas de pulmón. Diagramas de cajas que representan los niveles de expresión normalizados de β -F1-ATPasa (A), Hsp60 (B) y GAPDH (C) determinados por análisis con microarrays. En azul se representan los resultados de muestras de tejido normal y en rojo los de muestras de tejido tumoral: LAC (adenocarcinoma) y SLC (carcinoma escamosos de pulmón). Los datos de expresión normalizada están representados en forma logarítmica ($\text{Log}_2(\text{transformada})$). N indica el número de muestras analizadas. P es el P-valor cuando se comparan los resultados de expresión en muestras de tejido tumoral frente a los de tejido normal mediante la prueba t de Student. Fuente: <http://www.oncomine.org/>.

1.2.2. Relevancia fisiológica y clínica del fenotipo bioenergético en carcinomas de pulmón.

1.2.2.1. La pérdida de la capacidad bioenergética de la mitocondria correlaciona con un aumento del metabolismo glucolítico.

Hemos visto que el patrón de expresión de proteínas implicadas en vías de producción de energía en carcinomas de pulmón es diferente al que se observa en el tejido normal. En este punto, hemos querido demostrar que esta huella bioenergética hace referencia a cambios reales en el metabolismo energético del tumor y que además está relacionada con el proceso de carcinogénesis. Para ello, y en colaboración con el Dr. Fernando López-Ríos y médicos del Hospital Doce de Octubre, hemos estudiado por inmunohistoquímica la expresión de β -F1-ATPasa, Hsp60, GAPDH y PK (Lopez-Rios y cols., 2007) en una colección de 110 tumores de pulmón para los que hemos contado con la información clínica y los datos de seguimiento de los pacientes (Tabla A1 en Anexo I).

Con objeto de demostrar la relevancia fisiológica de la huella bioenergética del cáncer, hemos estudiado la correlación entre los datos de expresión de proteínas del metabolismo energético con la estimación del consumo de glucosa de estos tumores determinada por la captación del análogo no metabolizable 2-[^{18}F]-2-desoxiglucosa (FDG) y su visualización por tomografía de emisión de positrones (PET). La captación de FDG por los tejidos se puede expresar de forma semicuantitativa por la SUV (*Standardized uptake value*). Esta medida proporciona una indicación del primer paso regulado del metabolismo glucolítico y, por tanto, una estimación del consumo de glucosa por el tumor. Para minimizar el error debido al llamado efecto por volumen parcial (Soret y cols., 2007), para la cuantificación hemos considerado la SUV máxima ($\text{SUV}_{\text{máx}}$) (Tabla A1 en Anexo I). Por otro lado, dado que la $\text{SUV}_{\text{máx}}$ es una medida absoluta, hemos normalizado los valores de SUV por el diámetro máximo del tumor evaluado por los patólogos en el espécimen quirúrgico. A esta medida la hemos denominado $\text{SUV}_{\text{máx}}$ normalizada por tamaño (TSN-SUV).

En la Tabla 1 se resumen los resultados más relevantes de esta parte del estudio. Hemos observado una correlación directa entre la expresión de GAPDH y la $\text{SUV}_{\text{máx}}$ (Tabla 1), lo que sugiere que la captación de glucosa por el tumor esta ligada a la velocidad de utilización. Aunque no hemos observado una correlación entre la $\text{SUV}_{\text{máx}}$ y la expresión de PK (Tabla 1) los dos marcadores glucolíticos (GAPDH

	β -F1	Hsp60	GAPDH	PK	SUV _{máx}	Tamaño
Hsp60	R = 0,402 P < 0,001					
GAPDH	N.S.	N.S.				
PK	N.S.	N.S.	R = 0,368 P < 0,001			
SUV _{máx}	R = 0,191 P = 0,051	N.S.	R = 0,196 P = 0,044	N.S.		
Tamaño	N.S.	N.S.	R = 0,256 P = 0,018	N.S.	R = 0,564 P < 0,001	
NT-SUV	R = -0,308 P = 0,004	N.S.	N.S.	N.S.	R = 0,321 P = 0,003	R = 0,415 P < 0,001

Tabla 1: Análisis de la correlación entre los marcadores de la huella bioenergética, la SUV_{máx} y el tamaño de tumores de pulmón. En la tabla se muestran los resultados del análisis mediante la prueba χ^2 de Pearson. R es el coeficiente de correlación de Pearson y P el P-valor. Se destaca en negrilla cuando $P \leq 0,05$.

y PK) correlacionan significativamente, lo que apoyaría que en los tumores de pulmón se da una adaptación concertada al fenotipo glucolítico. Hemos observado una correlación inversa entre la expresión de β -F1-ATPasa y la TSN-SUV (Tabla 1), mientras que Hsp60 no correlaciona ni con la SUV_{máx} ni con la TSN-SUV (Tabla 1). Este hecho sugiere que la reducción de la expresión del marcador de la fosforilación oxidativa β -F1-ATPasa puede justificar el incremento en la captación de glucosa.

Los niveles de expresión de los marcadores pueden estar parcialmente influidos por el tamaño del tumor. Para descartar esta posible fuente de incertidumbre en el análisis, hemos introducido el tamaño del tumor junto con la expresión de β -F1-ATPasa en un modelo de regresión múltiple cuya variable de respuesta es la TSN-SUV. De este tipo de análisis se desprende que el tamaño del tumor ($P < 0,001$) y la expresión de β -F1-ATPasa ($P = 0,007$) son variables explicativas independientes para la TSN-SUV. Hemos realizado el mismo análisis sin incluir a los pacientes que en la mediastinoscopia revelaron un estadio avanzado de la enfermedad (estadios IIIA y IIIB) y que, por tanto, no se les prescribe la intervención quirúrgica, y hemos obtenido que las correlaciones se mantienen: GAPDH y SUV_{máx}, $R = 0,267$ y $P = 0,015$; β -F1 y NT-SUV, $R = -0,310$ y $P = 0,004$. En resumen, estos resultados indican que la estimación del fenotipo bioenergético mediante el índice proteómico que hemos denominado huella bioenergética del cáncer aporta una herramienta indicativa de la intensidad del metabolismo glucolítico del tumor.

Resultados

1.2.2.2. Valor diagnóstico y pronóstico del fenotipo bioenergético.

La existencia de un patrón de expresión diferencial de marcadores metabólicos en carcinomas de pulmón sugiere su posible aplicación clínica para el diagnóstico de tumores. Con objeto de determinar la potencial utilidad de la huella bioenergética del cáncer en diagnóstico hemos analizado de forma conjunta todos los valores de expresión de los marcadores y sus expresiones normalizadas (β -F1/Hsp60 y BEC) con EP-CLUST (<http://ep.ebi.ac.uk/EP/EPCLUST/>). Este programa aplica un

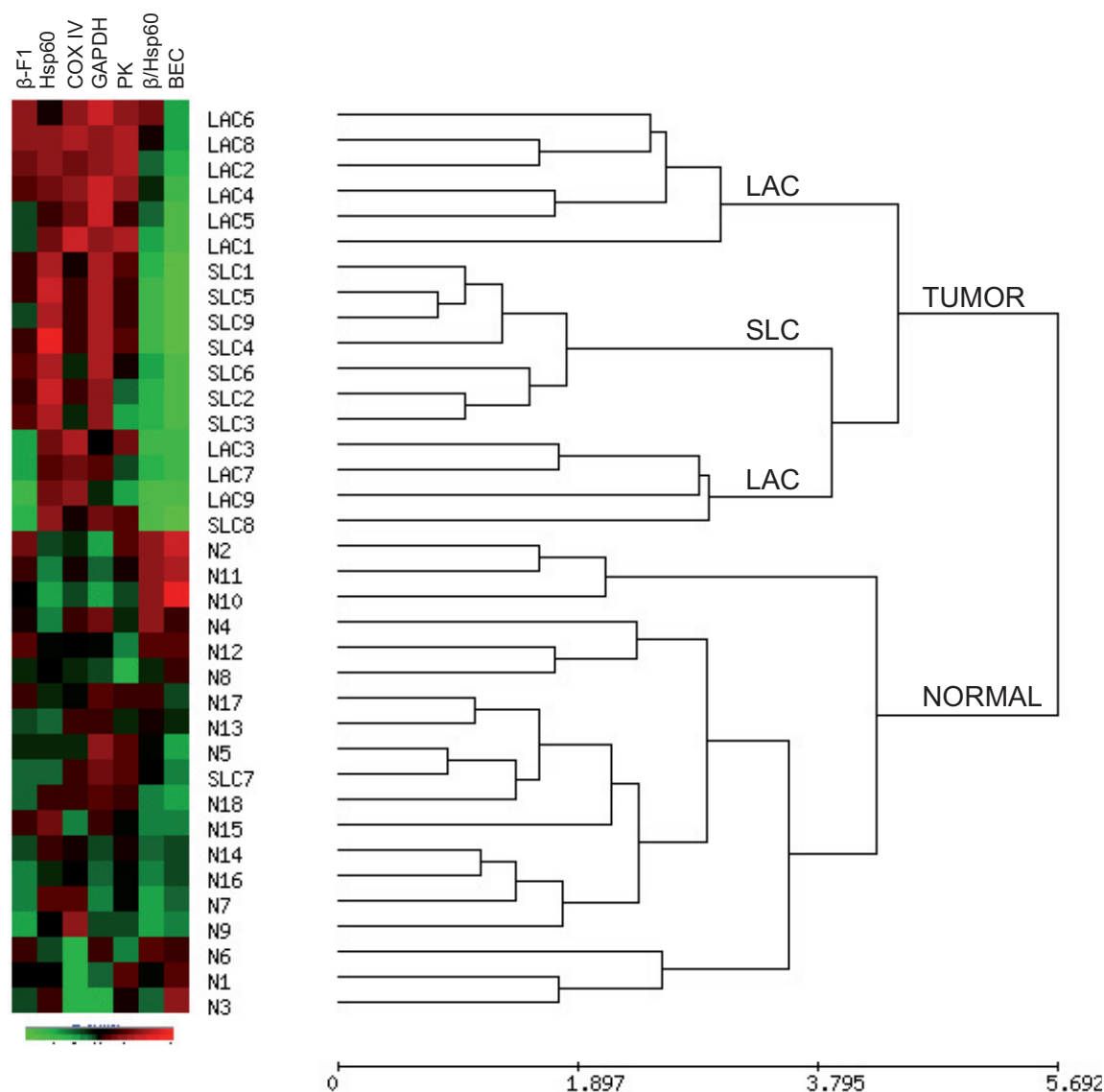


Figura 5: Análisis de la huella bioenergética en carcinomas de pulmón con EP-CLUST. La cuantificación de los niveles de expresión de los marcadores de la huella bioenergética (parte superior del panel) por *western blot* de 9 muestras de adenocarcinoma de pulmón (LAC) y de carcinoma escamoso de pulmón (SLC) se ha analizado de forma conjunta mediante el programa *EP-CLUST*. El valor de expresión de cada muestra se normaliza respecto a un valor de referencia (el valor medio de expresión de cada marcador en las muestras de tejido normal (N)). La gradación de colores (que está representada abajo a la izquierda) está codificada de forma que el rojo y el verde indican un valor mayor y menor al de referencia, respectivamente. El análisis genera el agrupamiento jerárquico de los pacientes por su huella bioenergética que se representa en forma de dendrograma.

algoritmo a los datos agrupando jerárquicamente las muestras por la semejanza de sus patrones de expresión. En la Figura 5 se muestran los resultados del análisis y se observa que el programa discrimina las muestras de tejido normal de las de tejido tumoral con una gran sensibilidad y especificidad. De hecho, el análisis discriminante de Fischer con estos marcadores aplicado a una población mayor de carcinomas de pulmón confirma la bondad de la huella bioenergética como marcador para el diagnóstico de adenocarcinomas de pulmón (Cuezva y cols., 2004).

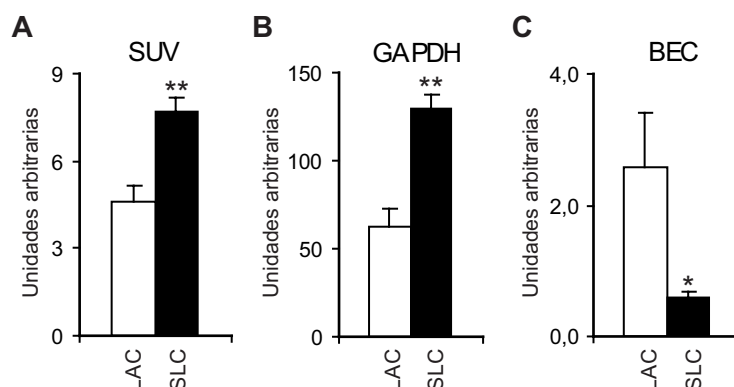


Figura 6: Análisis de la alteración del fenotipo bioenergético en adenocarcinoma (LAC) y carcinoma escamoso de pulmón (SLC). **A**, Análisis de la SUV_{\max} en LAC y SLC. **B**, Análisis inmunohistoquímico de la expresión de GAPDH en LAC y SLC. Los valores de expresión se obtienen a partir de la evaluación cualitativa de la intensidad de la señal (*scoring*) realizada por el patólogo (Lopez-Rios y cols., 2007) normalizada por el porcentaje de células inmuno-positivas de cada campo. Cada medida se realizó en tres campos y el valor asignado a cada muestra tumoral es la media de estas tres medidas. **C** Expresión normalizada de la expresión de los marcadores bioenergéticos determinada por inmunohistoquímica y evaluada como se detalla en (B). El BEC es el índice bioenergético celular que equivale al cociente β -F1/Hsp60/GAPDH. En los histogramas las barras representan la media de 110 tumores \pm S.E.M. * y **, equivalen a $P \leq 0,05$ y $0,01$ cuando se comparan las medias de LAC y SLC mediante la prueba t de Student.

Asimismo, del análisis con EP-CLUST se desprende que la huella bioenergética de LAC y SLC puede ser distinta (Fig. 5) ya que discrimina 2 sub-grupos de tumores en los que se integran respectivamente la mayoría de las muestras de LAC y las de SLC. En efecto, la comparación del patrón de expresión de los marcadores metabólicos determinados por IHQ en los dos tipos histológicos en la colección de 110 carcinomas de pulmón (Tabla A1 en Anexo I) revela diferencias significativas entre ambos tipos de carcinomas. Así, se observa un incremento significativo en la expresión de GAPDH en las muestras de SLC cuando se compara con LAC (Fig. 6). Este incremento va ligado a otro de magnitud similar de la SUV_{\max} (Fig. 6), lo que indica que las células de SLC son más glucolíticas que las de LAC (Figs. 3, 4 y 5). De acuerdo con estos resultados, el carcinoma escamoso muestra un índice BEC significativamente inferior al del adenocarcinoma (Fig. 6). Sin embargo, hay que

Resultados

destacar que el análisis realizado por *western blot* (Fig. 3B) no muestra diferencias significativas de los niveles de expresión de GAPDH en los dos tipos de carcinoma aunque sí que se mantiene la mayor reducción del valor del índice BEC en SLC (Fig. 3B). En cualquier caso, estos resultados confirman que es posible distinguir carcinomas de pulmón de distinto tipo histológico mediante el uso de marcadores del metabolismo energético así como por pruebas funcionales del mismo.

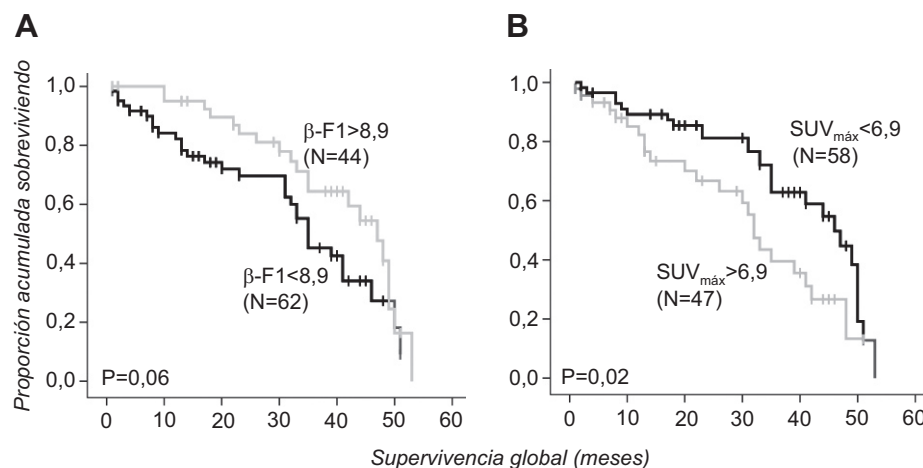


Figura 7: Análisis de la supervivencia de pacientes con carcinoma de pulmón. En las gráficas se muestran los resultados del análisis univariante de Kaplan-Meier de la supervivencia de pacientes estratificados por el valor medio de la expresión de β -F1-ATPasa (**A**) y de la $SUV_{m\acute{a}x}$ (**B**) en los tumores de pulmón. En el eje de ordenadas se muestra la proporción acumulada de pacientes que no han fallecido en cada grupo; en el eje de abscisas se muestra el tiempo de seguimiento en meses tras el diagnóstico de la enfermedad. N es el número de pacientes en cada grupo. P equivale al P-valor cuando se comparan los dos grupos mediante la prueba Log-Rango.

Por otro lado, el análisis univariante de la supervivencia global de pacientes estratificados por el valor medio de expresión de β -F1-ATPasa (Fig. 7A) y de la $SUV_{m\acute{a}x}$ (Fig. 7B) nos reveló que una menor expresión de β -F1 (Fig. 7A) y un mayor valor de $SUV_{m\acute{a}x}$ (Fig. 7B) están relacionados con una supervivencia menor en los pacientes. Estos resultados indican que la alteración del fenotipo bioenergético celular está relacionada con un peor pronóstico de los pacientes con carcinomas de pulmón y sugiere la posible implicación de la funcionalidad mitocondrial en el progreso de la enfermedad. Estos resultados, a su vez, sugieren la potencial utilidad de la alteración del fenotipo bioenergético como un marcador de pronóstico en la práctica clínica. Para confirmar esta afirmación hemos realizado análisis multivariante de la supervivencia global de los pacientes incluyendo como covariables la expresión de β -F1, la $SUV_{m\acute{a}x}$, y el estadio tumoral. El estadio del tumor es una característica clinico-patológica cuyo valor pronóstico, a día de hoy, está sobradamente demostrado (Gloeckler Ries y cols., 2003). Este análisis revela que la expresión de β -F1 ($P=0,044$), la $SUV_{m\acute{a}x}$ ($P=0,020$) y el estadio del tumor ($P=0,010$) son marcadores independientes de la supervivencia global de los pacientes con tumores de pulmón.

2. HuR es una proteína de unión al mRNA de β -F1-ATPasa que predice el riesgo de recidiva del cáncer de mama.

La alteración del fenotipo bioenergético se caracteriza por la disminución de la expresión relativa de β -F1-ATPasa en la célula en ausencia de cambios significativos en los niveles estacionarios de su mRNA, lo que sugiere la existencia de control post-transcripcional para la expresión de este gen en los tumores. Dado que el control de la traducción que sufre este mRNA durante el desarrollo del hígado de rata y en hepatomas está mediado por la unión al mRNA de factores específicos no identificados hasta el momento (Izquierdo y Cuezva, 1997; de Heredia y cols., 2000; Ricart y cols., 2002; Cuezva y cols., 2007), hemos buscado candidatos plausibles a partir de la información presente en la literatura. Entre ellos destaca HuR y, en esta parte del trabajo, hemos estudiado su interacción con el mRNA que codifica β -F1-ATPasa (β -mRNA) y su posible implicación en el desarrollo del fenotipo bioenergético de tumores de mama.

2.1. HuR es una proteína de unión al mRNA de β -F1-ATPasa.

2.1.1. HuR interacciona con el mRNA de β -F1-ATPasa en células humanas.

A partir de una selección inicial de candidatos, hemos escogido para estudiar empíricamente aquéllos para los que estuviera disponible un anticuerpo comercial (Fig. 8A), porque el criterio que hemos aplicado para el cribado de los candidatos es

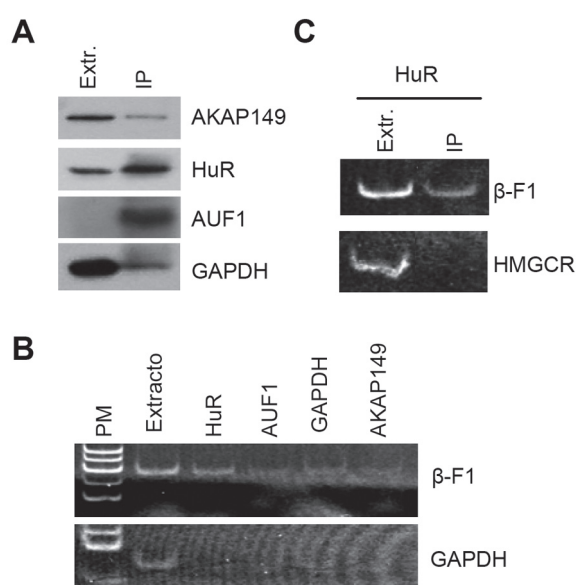


Figura 8: HuR interacciona con el mRNA de β -F1-ATPasa en células humanas. A, Inmunoprecipitación de distintas proteínas de unión a RNA (RNABPs) de extractos de células HEK. La detección específica de cada proteína en el inmunoprecipitado (IP) y en el extracto de partida (Extr.) se realiza mediante *western blot*. Los anticuerpos que se usan para la inmunoprecipitación y para la inmunodetección se indican a la derecha de los paneles. B y C, Inmunoprecipitación de β -mRNA ligada a RT-PCR. Se lleva a cabo la inmunoprecipitación de las RNABPs indicadas en la parte superior de los paneles de un extracto celular de HEK (B) o de HepG2 (C) y se realiza RT-PCR a partir del RNA extraído del material inmunoprecipitado con oligonucleótidos específicos para la detección del mRNA de β -F1-ATPasa y descartar la presencia de otros mRNAs celulares (GAPDH, HMGCRC).

la capacidad para inmunoprecipitar β -mRNA (Fig. 8B y C). Para ello, hemos fijado químicamente con formaldehído cultivos celulares creciendo exponencialmente y los hemos procesado para inmunoprecipitar específicamente las proteínas de unión a RNA (RNABPs) candidatas (Fig. 8A). La detección específica de la presencia de β -mRNA en el inmunoprecipitado (IP) se lleva a cabo por PCR (Fig. 8B y C). En la Fig. 8A se muestra la inmunoprecipitación específica de los correspondientes antígenos por parte de los anticuerpos empleados. De las RNABPs candidatas que se muestran en la Fig. 8B, β -mRNA sólo es detectable en el IP de células HEK realizado con anti-HuR. β -mRNA se identifica también cuando se inmunoprecipita HuR de otra línea celular humana (HepG2, Fig. 8C). Otros mRNAs celulares (GAPDH, HMG-CoA-Reductasa) no son detectables en los IPs lo que indica la especificidad de la interacción. Estos resultados sugieren que β -mRNA puede interaccionar con HuR en el contexto celular.

2.1.2. HuR interacciona *in vitro* con el 3'UTR del mRNA de β -F1-ATPasa.

Recientemente, el grupo de M. Gorospe ha publicado un trabajo en el que se identifican los mRNAs celulares que co-inmunoprecipitan con HuR en células HeLa (Lopez de Silanes y cols., 2005). Con algunas de las secuencias de estos mRNAs, los autores han generado un perfil con el programa COVE que proponen como la caja teórica de unión de HuR (Lopez de Silanes y cols., 2005). Nosotros hemos reproducido ese perfil y lo hemos enfrentado a la secuencia de β -mRNA, obteniendo un elemento conservado del 3'UTR (Fig. 9A). Estos resultados *in silico* sugieren que HuR puede interaccionar con la región 3'UTR de β -mRNA.

Para confirmar esta posible interacción, hemos realizado ensayos de interacción *in vitro* ligados a precipitación específica del RNA (RNA *pull-down*). En la Fig. 9B mostramos un esquema del fundamento de este tipo de ensayos. Hemos desarrollado unas construcciones a partir de las que se pueden sintetizar *in vitro* RNAs híbridos (hRNA) que contienen la secuencia diana (3'UTR o β -mRNA) unida a 3 horquillas que son el sitio de interacción de la proteína de la cápsida (CP) del fago MS2. Estos hRNAs se incuban con extractos proteicos, que son la fuente biológica de las RNABPs que queremos capturar. Posteriormente, se añade una proteína de fusión formada por la CP y la proteína de unión a maltosa (MBP), que se une al hRNA y forma un mega-complejo con las RNABPs que se precipita específicamente mediante la adición de resina de amilosa (ver Fig. 9B). Las RNABPs se solubilizan digiriendo el puente de hRNA por un tratamiento con

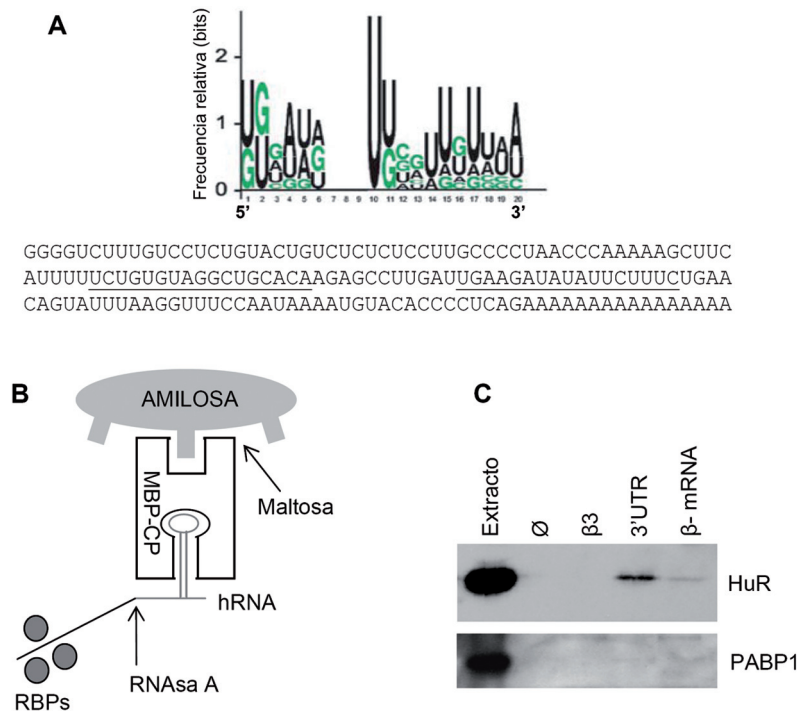


Figura 9: HuR interacciona con el 3'UTR del mRNA de β -F1-ATPasa. **A**, Motivos de RNA diana de unión de HuR en el 3'UTR de β -mRNA. Matriz de probabilidad que muestra la frecuencia relativa (eje de ordenadas) de encontrar un nucleótido en una posición concreta (abscisas) (Lopez de Silanes y cols., 2004). Debajo, se muestra la secuencia del 3'UTR de β -mRNA. Los tramos secuencia subrayados representan sitios potenciales de unión de HuR según el perfil de la matriz. **B**, Esquema de la aproximación para la precipitación específica de RNA. Un RNA híbrido formado por la secuencia diana (línea negra) a la que se unen proteínas de unión a RNA (RBPs) y las horquillas del virus MS2 (línea gris), se incubaba con un extracto celular de HEK. Los complejos se precipitan específicamente mediante la proteína de fusión formada por la proteína de la cápsida del virus MS2 (CP), que se une con alta afinidad a la horquilla MS2 (línea gris), y la proteína de unión a maltosa (MBP), y resina de amilosa, que adsorbe específicamente a la región MBP de la proteína de fusión. La elución de los complejos precipitados se lleva a cabo mediante la degradación del RNA híbrido con RNAsa o por la desorción de la MBP-CP de la resina con maltosa. **C**, Inmunodetección específica de HuR mediante *western blot* en las proteínas purificadas con el método descrito en **B**. En la parte superior del panel se muestran las secuencias diana (3'UTR y β -mRNA) de los distintos RNAs híbridos que se han usado en las purificaciones. Como controles se muestran los resultados de purificaciones en las que no se ha incluido RNA híbrido (Ø) o un RNA híbrido que contiene una secuencia de β -mRNA que no une RBPs (β3). Como control del *western blot* se usa un anticuerpo contra una RBP muy abundante (PABP1) en las mismas muestras.

RNAsa o por la elución de la MBP-CP de la amilosa mediante la adición de maltosa y finalmente se analizan por *western blot*. En la Fig. 9C se muestra la detección específica de HuR en las proteínas eluidas cuando el hRNA que se usa como cebo contiene el 3'UTR de β -mRNA. La especificidad de la interacción se ilustra por la ausencia de inmunorreactividad cuando no se añade RNA en el experimento (Ø) o el hRNA incluye una región del ORF de β -mRNA (β3) que no une RNABPs (Fig. 18A; Ricart y cols., 2002). Además, otra RNABP muy abundante (PABP) no se detecta en ninguna de las fracciones analizadas, lo que refuerza la especificidad del método de purificación de HuR (Fig. 9C). Hay que señalar que a pesar de que

se incluye la misma cantidad de moles de hRNA en cada experimento, la cantidad de HuR detectada cuando se usa β -mRNA completo es sensiblemente menor que cuando se usa el 3'UTR (Fig. 9C). Esto nos sugiere la existencia de estructuras secundarias que pueden enmascarar parcialmente el sitio de unión a HuR en el mRNA. Globalmente estos resultados indican que HuR puede interaccionar con β -mRNA a través del 3'UTR.

2.1.3. HuR interacciona, cofracciona y colocaliza con el complejo ribonucleoproteico del mRNA de β -F1-ATPasa en células de rata.

Con objeto de ver si la interacción que hemos descrito con HuR es relevante desde el punto de vista fisiológico, en esta parte del trabajo hemos estudiado si esta interacción es coherente con las características que le hemos atribuido a las RNABPs de β -mRNA en estudios previos (Egea y cols., 1997; Ricart y cols., 2002). En este sentido, partiendo de un extracto proteico de células de rata (NRK) y el hRNA que contiene el 3'UTR de β -mRNA, hemos reproducido las condiciones de incubación y de irradiación UV de los ensayos en los que se identificó inicialmente la interacción del 3'UTR con las β -mRNABPs (Izquierdo y Cuezva, 1997; Ricart y cols., 2002). Posteriormente, hemos purificado las proteínas asociadas al RNA y analizado la presencia de HuR en el eluido por *western blot* (Fig. 10A). Dado que queremos determinar si HuR se une directamente al 3'UTR de β -mRNA se realizan lavados de alta astringencia de la columna (ver pie de Fig. 10). En la Figura 10A se ve que HuR se retiene en la columna durante los lavados y que se eluye específicamente por el tratamiento con RNasa A. Estos resultados apoyan que HuR y el 3'UTR de β -mRNA de rata estaban interaccionando directamente en el momento de la irradiación UV.

En segundo lugar, β -mRNA está acomplexado y forma parte de una ribonucleopartícula (RNP o β -RNP) de gran tamaño que se encuentra asociada a la membrana externa mitocondrial (Egea y cols., 1997). Esta RNP co-fracciona con las mitocondrias en gradientes de sacarosa de alta resolución en fracciones de alta densidad (Ricart y cols., 2002). En este trabajo, hemos encontrado que una parte de HuR co-fracciona con β -mRNA y con las mitocondrias (identificadas por la inmunodetección de la proteína β -F1-ATPasa) (Fig. 10B). Sin embargo, HuR también aparece en otras fracciones del gradiente lo que sugiere su implicación en la formación de otros complejos ribonucleoproteicos (Kedersha y cols., 2005).

Por último, el complejo ribonucleoproteico que contiene β -mRNA se observa al microscopio electrónico como un partícula de forma redondeada de unos 150 nm de diámetro (Egea y cols., 1997). De acuerdo con estos datos, la detección de HuR por inmunomicroscopía electrónica en secciones finas de hígado de rata nos ha permitido su identificación en la periferia de la mitocondria (Fig. 10C). Además, el análisis en fracciones del gradiente de sacarosa (Fig. 10B) que contiene β -RNPs parcialmente purificadas (Fig. 10D; Ricart y cols., 2002) muestra la presencia de

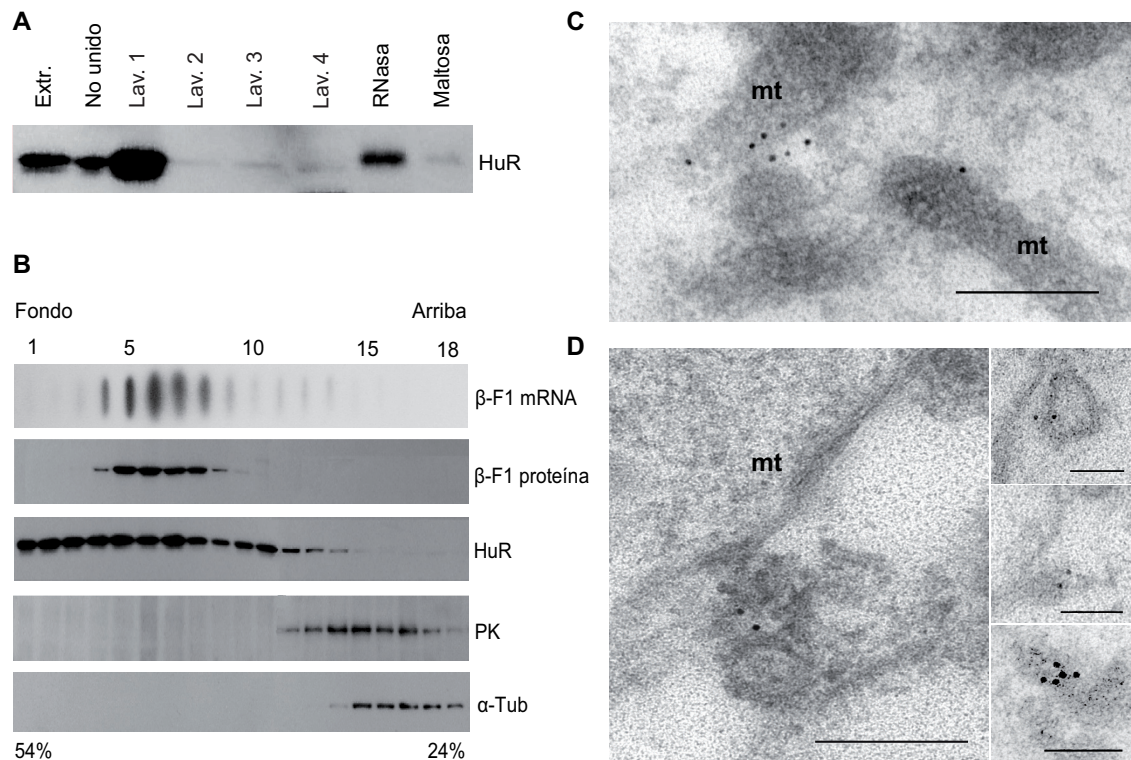


Figura 10: HuR forma parte del complejo ribonucleoproteico de β -mRNA que está asociado a las mitocondrias. **A**, β -mRNA interacciona de forma específica con HuR de células de rata. El RNA híbrido que comprende β -mRNA de rata se incubó con un extracto proteico de células NRK. Finalizada la incubación se induce el entrecruzamiento covalente de RNA-proteína mediante irradiación UV y se precipita específicamente el RNA mediante la adición de MBP-CP y amilosa (ver fig. 8A). Se realizan entonces 4 lavados de distinta astringencia: *Lav. 1* y 4 con tampón RLN, *Lav. 2* con tampón RLN + NaCl 0,3M y *Lav. 3* con tampón RLN + Nonidet P-40 1%, y finalmente, se realizan dos eluciones sucesivas con RNasa A y maltosa. Las distintas fracciones del proceso se analizan por *western blot* para determinar la presencia de HuR. **B**, Colocalización de β -mRNA, las mitocondrias y una fracción de HuR. Se fraccionan extractos posnucleares de hígado fetal de rata en gradientes de sacarosa de alta resolución (24-54%). El RNA extraído de las fracciones del gradiente (18) se analiza mediante *slot blot* e hibridación con una sonda específica de β -mRNA. La proteína extraída de las mismas fracciones se analiza por *western blot* y los anticuerpos utilizados se señalan a la derecha de los paneles. β -F1 proteína y α -Tubulina se utilizan como marcadores de las mitocondrias y el citoplasma, respectivamente. **C** y **D**, Estudio de la localización subcelular de HuR por inmunocitoquímica y microscopía electrónica en secciones ultra-finas de hígado (**C**) y en la fracción 7 (**D**) del gradiente de sacarosa (**B**). La inmunodetección de HuR está acoplada a la deposición de partículas de oro de 10 nm. En las imágenes se distinguen ultraestructuralmente las mitocondrias (mt). En los micrografías grandes en **C** y **D**, las barras equivalen a 200 nm; en las micrografías pequeñas en **D**, las barras equivalen a 100 nm.

Resultados

HuR en estructuras densas a electrones de forma redondeada de aproximadamente 150 nm de diámetro y asociadas a la mitocondria (Fig. 10D). En conjunto, estos resultados sugieren la implicación de HuR en la expresión localizada y regulada de β -mRNA.

2.2. Relevancia de HuR en tumores de mama

El 3'UTR de β -mRNA es un elemento esencial para su traducción (Izquierdo y Cuezva, 1997; Di Liegro y cols., 2000). Por lo tanto, la interacción de HuR con este elemento regulador que hemos descrito nos ha sugerido que HuR podría estar controlando la expresión de esta proteína mitocondrial pudiendo ser responsable de la alteración del fenotipo bioenergético celular que caracteriza a muchos tumores humanos.

2.2.1. HuR se encuentra sobre-expresado en tumores de mama.

Con este objetivo, hemos estudiado en primer lugar la expresión de HuR en paralelo con otros marcadores de la huella bioenergética en muestras normales y tumorales procedentes de 10 pacientes con adenocarcinomas primarios ductales invasivos de mama. En la Figura 11 se observa que HuR es prácticamente indetectable en el tejido normal mientras que su expresión está claramente aumentada en el tejido tumoral. Este resultado nos sugiere que la sobre-expresión de HuR se da en paralelo a la represión de β -F1-ATPasa en las muestras que hemos estudiado.

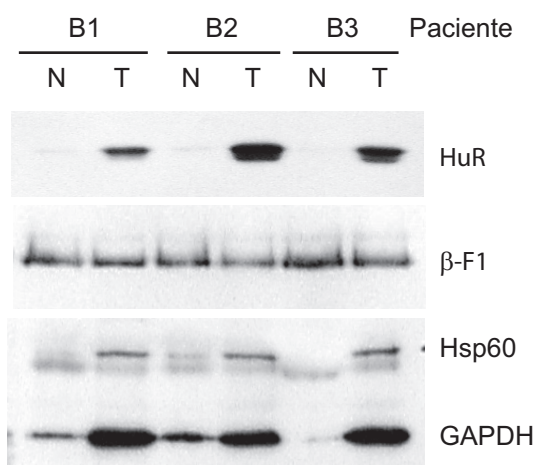


Figura 11: HuR está sobre-expresado en tumores de mama. Resultados de *western blot* representativos de muestras de carcinoma de mama (T) y del tejido normal (N) de 3 pacientes (B1, B2 y B3). Los anticuerpos contra HuR, proteínas mitocondriales (β -F1 y Hsp60) y glucolíticas (GAPDH) que se han usado están señalados a la derecha de los paneles.

2.2.2. HuR y la huella bioenergética del cáncer.

Para aclarar si existe o no una asociación entre la expresión de HuR y los marcadores de la huella bioenergética del cáncer hemos llevado a cabo un estudio retrospectivo en colaboración con el grupo Oncopaz que dirige el Dr. Manuel González-Barón. En este trabajo hemos analizado la expresión de HuR en una muestra de 89 carcinomas de mama (Tabla A2 en Anexo I) en la que se ha estudiado previamente la expresión de los marcadores de la huella bioenergética y de la que se dispone de los datos clínicos y de seguimiento de las pacientes (Isidoro y cols., 2005). En concreto, el agrupamiento jerárquico con el programa EPCLUST basado en el análisis conjunto de los niveles de expresión de los marcadores de la huella bioenergética da lugar a tres grupos distintos de carcinomas. Estos grupos se caracterizan por su divergencia de la huella bioenergética de las muestras de tejido normal (Isidoro y cols., 2005). Así, los grupos se definen como de *baja (L)*, *media (M)* y *alta (H)* divergencia del fenotipo normal. La expresión de HuR correlaciona significativamente con la divergencia de la huella bioenergética ($P < 0,001$, χ^2), siendo mayor en el grupo H que en los grupos L y M. Sin embargo, la expresión de HuR no correlaciona con los grupos generados a partir de otros marcadores clínico-patológicos relevantes para el estudio de la progresión tumoral como la afectación nodular ($P = 0,225$, χ^2), el estadio clínico ($P = 0,063$, χ^2) y el grado histológico ($P = 0,487$, χ^2).

Con objeto de relacionar la alteración del fenotipo bioenergético celular con la expresión de HuR, hemos generado dos grupos de tumores tomando como punto de corte el valor medio de la expresión de HuR en el grupo M. De esta forma, definimos dos grupos de alta (H) y baja (L) expresión de HuR, que están asociados con una alta y baja desviación del fenotipo bioenergético, respectivamente (Fig. 12A). De hecho, en estos grupos determinados por el nivel de expresión de HuR los niveles de expresión de los marcadores relevantes de la huella bioenergética son significativamente distintos (Fig. 12A). Estos resultados sugieren que la expresión de HuR está ligada a la alteración del fenotipo bioenergético de los tumores de mama.

2.2.3. HuR es un marcador independiente de progresión del cáncer de mama.

Hemos descrito que la alteración del fenotipo bioenergético celular está asociada a la progresión del cáncer de mama (Isidoro y cols., 2005). Por lo tanto, el siguiente

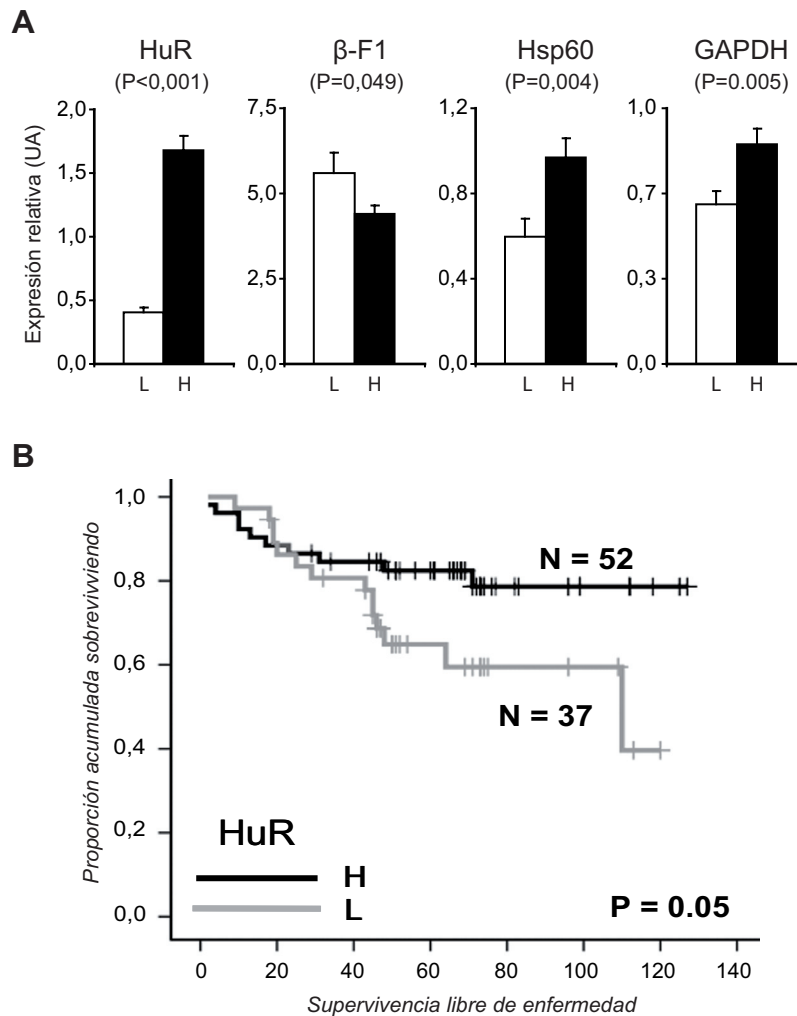


Figura 12: La expresión de HuR correlaciona con la alteración de la huella bioenergética de tumores de mama y es relevante en progresión tumoral. **A**, Análisis de la expresión por *western blot* de HuR y los marcadores de la huella bioenergética en 89 tumores de mama. Se han estratificado los pacientes en dos grupos de alta (H, barras negras) o baja (L, barras blancas) expresión de HuR. Ver sección 2.2.2. en el texto para más detalles. Los histogramas muestran la media \pm S.E.M. de los valores de expresión en cada grupo. La comparación de las medias de la expresión de los distintos marcadores en ambos grupos se analiza mediante la prueba t de Student y el P-valor de cada análisis se muestra sobre el histograma correspondiente. **B**, Análisis univariante de Kaplan-Meier de la supervivencia libre enfermedad de pacientes con tumores de mama estratificados por el nivel de expresión de HuR. En el eje de ordenadas se muestra la proporción acumulada de pacientes que no han desarrollado metástasis en cada grupo; en el eje de abscisas se muestra el tiempo de seguimiento en meses tras la operación. N es el número de pacientes en cada grupo. P es el P-valor cuando se comparan los dos grupos mediante la prueba Log-Rango.

paso en este estudio ha sido establecer una relación entre la expresión de HuR y la recidiva del tumor y determinar su posible aplicación como marcador de pronóstico. Sorprendentemente, el análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad (SLE) de las pacientes con alta y baja expresión de HuR revela que una baja expresión de HuR conlleva un peor pronóstico (Fig. 12B y Tabla A3 en Anexo I).

La alteración del fenotipo bioenergético predice un mayor riesgo de recidiva del tumor, así que nos hemos preguntado si la expresión de HuR podría aportar una información adicional para el pronóstico de los pacientes. Así, hemos estudiado si la expresión de HuR tiene validez para el pronóstico de pacientes incluidos en grupos de bajo riesgo. Por ello, en primer lugar hemos analizado qué marcadores clinico-patológicos y bioenergéticos están asociados de forma significativa con progresión tumoral (Tabla A3 en Anexo I). El análisis univariante de la SLE revela que el número de nódulos afectados ($P=0,001$), un estadio clínico avanzado ($P=0,001$) y el grado histológico ($P=0,041$) son los parámetros clinico-patológicos que están asociados significativamente con la progresión de la enfermedad (Tabla A3 en Anexo I). En la Tabla 2, se muestra el análisis de la supervivencia de pacientes con alta (H) y baja (L) expresión de HuR en los subgrupos de buen pronóstico definidos por los marcadores clinico-patológicos citados así como por parámetros

	Grupo de pacientes	HuR	N	(%)	Ev.	SLE 5 años, (prop)	SEM	95% IC	P
V. Clínicas	Nódulos 0-3	L	33	(45)	11	0,67	0,09	0,50 0,84	0,024
		H	40	(55)	5	0,87	0,05	0,77 0,98	
	Estadios I + II	L	32	(46)	10	0,69	0,09	0,52 0,86	0,021
		H	38	(54)	4	0,89	0,05	0,79 0,99	
	Grado 1 + 2	L	14	(42)	5	0,79	0,11	0,57 1,00	0,028
		H	19	(58)	1	0,95	0,05	0,85 1,05	
V. Bioenergéticas	L+M	L	32	(59)	13	0,59	0,09	0,41 0,77	0,012
		H	22	(41)	2	0,91	0,06	0,79 1,03	
	β -C2	L	9	(53)	7	0,14	0,13	0,11 0,00	0,034
		H	8	(47)	3	0,75	0,15	0,46 1,04	

Tabla 2: Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en grupos de buen pronóstico de pacientes estratificadas por los niveles de expresión de HuR. Se han seleccionado grupos de pacientes de buen pronóstico identificados a partir de aquellos marcadores que son significativos para el pronóstico en análisis univariante de supervivencia libre de enfermedad (Tabla A3 en anexo I). Éstos son de tipo bioenergético (la alteración de la huella bioenergética y la expresión de β -F1) o clínico-patológicos (Presencia de nódulos, estadio clínico y grado histológico). Estos grupos se muestran a la izquierda en la tabla. Los resultados que se muestran corresponden al análisis univariante de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes de estos grupos estratificados por la expresión de HuR. Eventos hace referencia al número de pacientes dentro de cada subgrupo que presenta recidiva. SLE 5 años hace referencia a la proporción acumulada de pacientes de cada sub-grupo que no ha presentado recidiva en el periodo de 5 años tras la operación. Para este valor se muestra asimismo el S.E.M. y el intervalo de confianza (95% IC). P es el P-valor cuando se comparan los dos grupos mediante la prueba Log-Rango y se destaca en negrilla cuando $P \leq 0,05$.

Resultados

bioenergéticos. En efecto, la probabilidad de recidiva de la enfermedad a los 5 años de seguimiento (*SLE 5 años*) es superior en aquellas pacientes con baja expresión de HuR (Tabla 2).

Hay que destacar que dentro del grupo que no muestra una alta desviación del fenotipo bioenergético normal (*L+M* en Tabla 2) una baja expresión de HuR también implica un riesgo elevado de recurrencia de la enfermedad. Además, hemos incluido en el análisis un grupo de pacientes que presentan un riesgo de recaída muy elevado (β -C2 en Tabla 2) asociado a una expresión de β -F1-ATPasa anormalmente alta (Isidoro y cols., 2005). En este grupo, una baja

Covariable		H.R	95% IC		P
A	Nódulos				N.S.
	Estadio				N.S.
	Grado				N.S.
B	HuR-L	3.23	1.40	7.74	0.006
	β -C2	3.78	1.63	8.75	0.002
	GAPDH-H	2.35	1.01	5.49	0.048
C	HuR-L	3.72	1.43	9.72	0.007
	β -C2	3.47	1.48	8.15	0.004
	GAPDH-H	2.17	0.86	5.47	0.102
	Nódulos				0.005
	1-3 vs. 0	1.79	0.60	5.36	0.297
	> 3 vs. 0	5.61	1.91	16.5	0.002
D	HuR-L	3.94	1.50	10.3	0.005
	β -C2	3.49	1.49	8.14	0.004
	GAPDH-H	2.16	0.87	5.36	0.097
	Estadio				0.007
	I vs. III				N.S.
	II vs. III	0.24	0.10	0.58	0.002
E	HuR-L	4.51	1.68	12.2	0.003
	β -C2	3.11	1.19	8.09	0.020
	GAPDH-H	2.93	1.16	7.40	0.023
	Grado				N.S.

Tabla 3: Análisis multivariante de la supervivencia libre de enfermedad de pacientes con tumores de mama. Los marcadores (bioenergéticos y clínico-patológicos) significativos en el análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad (Tabla A3 anexo I) se han incluido (covariables) en un análisis de regresión proporcional multivariante de Cox. Riesgo relativo (H.R. o *hazard ratio*), intervalo de confianza de esta medida (95% IC). En negrilla cuando $P \leq 0,05$ con la prueba de Wald. Este valor indica la independencia de cada covariable como marcador pronóstico. N.S., no significativo cuando $P > 0,05$.

expresión de HuR define un subgrupo con un riesgo extremadamente elevado de metástasis (Tabla 2). Estos dos últimos resultados sugieren que la asociación de la alteración del fenotipo bioenergético celular y la expresión de HuR es más compleja de lo que en principio cabría esperar. De hecho, la expresión de HuR es un marcador de progresión tumoral independiente de los marcadores clínico-patológicos y bioenergéticos (Tabla 3). Hemos realizado análisis multivariantes de Cox incluyendo la expresión de HuR, los marcadores bioenergéticos y uno de los clínico-patológicos y en todos los casos el resultado ha sido significativo (Tabla 3). Hemos incluido un solo marcador clínico-patológico en cada análisis puesto que no son marcadores independientes entre sí (Tabla 3). En conjunto, estos resultados muestran la posible utilidad de la expresión de HuR en el pronóstico clínico de las pacientes con carcinoma de mama apoyando su implementación por el incremento informativo que supone el uso combinado con otros marcadores (clínicos y bioenergéticos) para la estratificación de las pacientes.

2.3. La sobre-expresión de HuR en células humanas no afecta la expresión de β -F1-ATPasa.

Una vez que hemos demostrado que existe una correlación entre la expresión de HuR y la alteración del fenotipo bioenergético celular, hemos querido entender cómo se concreta esta asociación en términos moleculares y celulares. Con este objetivo, hemos sobre-expresado HuR en células humanas para estudiar el efecto

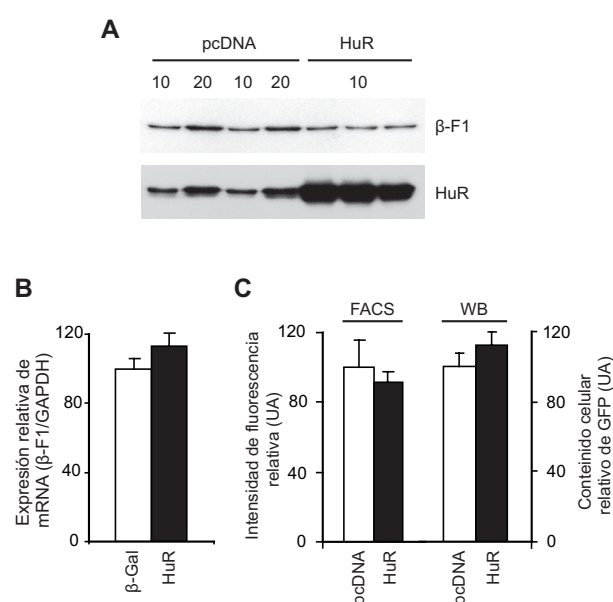


Figura 13: La sobre-expresión de HuR no afecta a la expresión de β -F1-ATPasa. **A**, La sobre-expresión de HuR no tiene efecto sobre los niveles estacionarios de β -F1-ATPasa. La expresión de β -F1-ATPasa en células HEK transfectadas con HuR o un plásmido vacío (pcDNA) se analiza por *western blot*. 10 y 20 indican distintas cantidades de proteína de las muestras control (en μ g) mostrando la respuesta de los anticuerpos. **B**, La sobre-expresión de HuR no promueve cambios en los niveles estacionarios de β -mRNA. β -mRNA se analiza en células HEK transfectadas con HuR (barra negra) o con β -galactosidasa (barra blanca) mediante RT-qPCR. Para la cuantificación se usan células no transfectadas como muestra calibradora y los resultados se normalizan con GAPDH como gen de referencia. Los

resultados son la media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes. **C**, La sobre-expresión de HuR no promueve cambios en la expresión ectópica de quimeras de GFP que incluyen el 3'UTR de β -mRNA. La expresión de la quimera GFP-3'UTR en células HEK co-transfectadas con HuR (barras negras) o un plásmido vacío (pcDNA, barras blancas) se analizan por citometría de flujo (FACS) y por *western blot* (WB). Los resultados son la media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes. UA, unidades arbitrarias.

Resultados

que produce en la expresión de β -F1-ATPasa. Contrariamente a lo esperado, la sobre-expresión de HuR en células no promueve cambios significativos ni en los niveles de proteína (Fig. 13A) ni en los niveles de RNA (Fig. 13B) de β -F1-ATPasa. Además, la sobre-expresión de HuR tampoco promueve cambios significativos en la expresión ectópica de quimeras de GFP que incluyen el 3'UTR de β -mRNA (Martínez-Díez y cols., 2006), valorado tanto por citometría de flujo (Fig. 13C, histograma izquierdo) como por *western blot* (Fig. 13C, histograma derecho). Estos resultados están en aparente contradicción con un trabajo publicado recientemente (Izquierdo, 2006). Por tanto, para determinar si la sobre-expresión de HuR tiene algún efecto específico sobre la traducción de β -F1-ATPasa que pudiera no ser detectado con claridad por las técnicas citadas anteriormente, hemos analizado la velocidad de síntesis *in vivo* de β -F1-ATPasa (Fig. 14). Para ello, se realiza un marcaje metabólico de corta duración (30 min) de células que sobre-expresan HuR o β -galactosidasa y posteriormente se inmunoprecipita β -F1-ATPasa y se visualiza el producto marcado en ese tiempo (Fig. 14A). Hay que destacar que la sobre-expresión de HuR produce un efecto global sobre la tasa de síntesis proteica de tal manera que la velocidad de incorporación de ^{35}S -Met a proteína total de la célula disminuye aproximadamente un 30% cuando se compara con las células

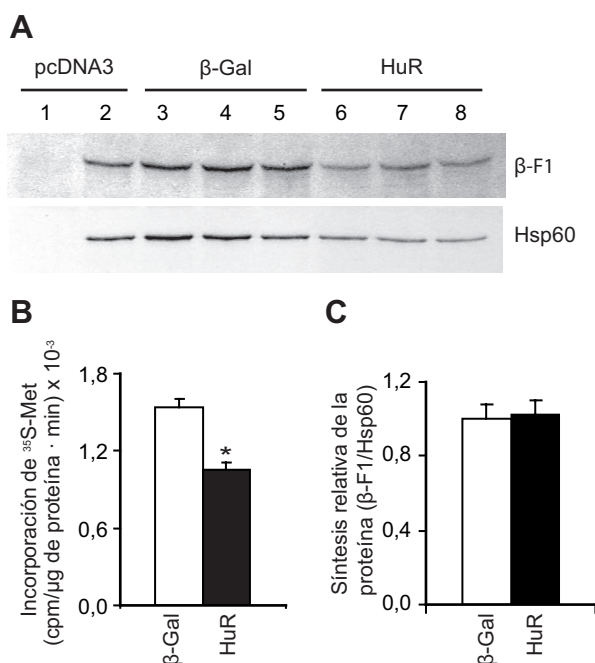


Figura 14: Efecto de la sobre-expresión de HuR en la síntesis *in vivo* de β -F1-ATPasa. **A**, Análisis de la síntesis *in vivo* a corto plazo de β -F1-ATPasa. Se realiza un marcaje metabólico (^{35}S -met) de las proteínas de células HEK transfectadas transitoriamente con HuR, β -Galactosidasa (β -Gal) o un plásmido vacío (pcDNA). A continuación, se inmunoprecipitan β -F1-ATPasa y Hsp60, y se visualiza la proteína sintetizada durante el marcaje por exposición autorradiográfica de los geles donde se fraccionan los inmunoprecipitados. 1, inmunoprecipitados con suero pre-inmune (panel superior) e IgGs de ratón (panel inferior); 2-8, inmunoprecipitados con los anticuerpos que se indican a la derecha del panel de las células transfectadas con las construcciones que se indican en la parte superior del panel. **B**, La sobre-expresión de HuR altera la síntesis global

de proteínas. Se precipita la proteína total de células tratadas como se indica en (A), y se valora la incorporación de ^{35}S -met a la proteína celular por conteo. Los resultados son la media \pm S.E.M. de 4 experimentos independientes. *, $P \leq 0,05$, cuando se comparan las medias de células transfectadas con β -Gal y con HuR usando la prueba t de Student. **C**, La sobre-expresión de HuR no tiene un efecto significativo sobre la síntesis relativa de β -F1-ATPasa. La cuantificación de β -F1 marcada en los inmunoprecipitados de células tratadas como se indica en (A) se normaliza respecto a la de Hsp60 de la misma muestra de partida. Los resultados son la media \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes.

control (Fig.14B). Por lo tanto, para expresar la velocidad relativa de síntesis de β -F1-ATPasa, hemos normalizado los datos respecto a la síntesis de otra proteína mitocondrial usada como control (Hsp60, Fig. 14A y C). Los resultados indican que la velocidad relativa de síntesis *in vivo* de β -F1-ATPasa cuando se sobre-expresa HuR (Fig. 14C) no es significativamente distinta del control (β -gal en Fig. 14C). Globalmente, podemos concluir que a pesar de que HuR interacciona con el 3'UTR de β -mRNA y su expresión está asociada a la alteración del fenotipo bioenergético celular de tumores de mama, no parece que juegue un papel específico en el control de la expresión de β -F1-ATPasa.

3. Purificación e identificación de las proteínas que se unen a β -mRNA.

Hemos realizado un cribado de RNABPs y hemos descrito que HuR es un factor que se une a β -mRNA. Sin embargo, esta aproximación presenta algunas limitaciones para identificar todas las β -mRNABPs. (i) Existen multitud de RNABPs y mucha de la información que se publica sobre ellas es, en ocasiones, contradictoria o está condicionada al sistema experimental empleado. (ii) Para la gran mayoría de ellas no existen anticuerpos disponibles comercialmente. (iii) Recientemente se están describiendo como RNABPs proteínas a las que se les había atribuido otra función (GAPDH, AKAP149, G3BP). Y lo que es más importante, (iv) β -mRNA interacciona con varias proteínas (Ricart y cols., 2002) y está inmerso en el seno de una ribonucleopartícula (Egea y cols., 1997; Ricart y cols., 2002) que probablemente involucra a más factores (proteínas y/o RNAs) (Keene, 2007). Por lo tanto, se hace necesario desarrollar una técnica de purificación e identificación de RNABPs a gran escala.

3.1. Desarrollo del método de purificación de RNABPs.

3.1.1. Implementación inicial de un método descrito.

Para abordar la purificación de RNABPs hemos decidido aplicar una técnica propuesta inicialmente por Bardwell y Wickens y posteriormente aplicada y desarrollada en los laboratorios de R. Reed y M.J. Moore. Este método se basa en la alta afinidad ($K_d \sim 10^{-9}$) que existe entre la proteína de la cápsida del bacteriófago MS2 (CP) y una pequeña horquilla de su RNA genómico. Podemos reclutar RNABPs específicas a un RNA híbrido (hRNA) que incluye la secuencia diana conocida para esas RNABPs unida a tres horquillas MS2. Los complejos hRNA-RNABPs

Resultados

se precipitan específicamente cuando se incuban con una proteína que incluye la CP fusionada a la proteína de unión a maltosa (MBP), ya que esta proteína de fusión puede unirse al hRNA por medio de la CP y a resina de amilosa a través de MBP. En la Figura 9B y en las citadas referencias se muestra esquemáticamente el fundamento de la técnica.

Como se menciona en la sección 2.1.2 de Resultados, hemos desarrollado 3 hRNAs para estos experimentos. β -mRNA-MS2 incluye la secuencia completa de β -mRNA y en su extremo 3' las tres horquillas MS2; hUTR-MS2 incluye el 3' UTR, que sabemos que es la región más relevante para el control de la traducción de β -mRNA; y h β 3-MS2, que incluye una región de β -mRNA que, como veremos más adelante (Fig. 18A), no une RNABPs y nos sirve como control negativo de la técnica.

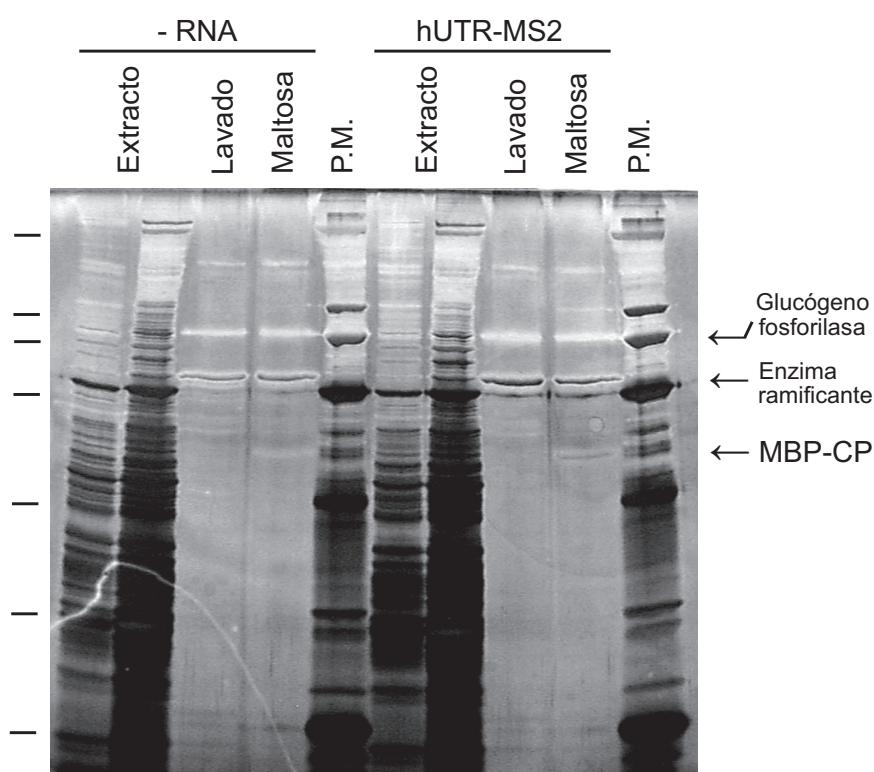


Figura 15: Implementación inicial para la purificación de β -RBPs de un método descrito por Zhou y Reed. Resultado de un experimento representativo de la purificación de las RBPs al 3'UTR de β -mRNA. En este experimento se incubó el RNA híbrido formado por el 3'UTR de β -RNA humano unido a las tres horquillas MS2 (hUTR-MS2) con un extracto post-nuclear de hígado de rata. Posteriormente se añade la proteína de fusión MBP-CP y resina de amilosa. La resina con los complejos RNA-proteína se lavan (Lavado) y se eluyen con maltosa. Como control negativo se lleva en paralelo un experimento en el que no se añade hRNA (- RNA). Se señalan con flechas las bandas identificadas por MALDI-TOF. A la izquierda del panel se muestra la movilidad electroforética aparente de la mezcla de proteínas de peso molecular conocido.

Hemos llevado a cabo varios experimentos de purificación de RNABPs siguiendo el protocolo publicado por Reed (Zhou y cols., 2002). Inesperadamente, nosotros hemos obtenido un rendimiento muy bajo en cuanto a la obtención final de RNABPs y que no parecía depender de la cantidad de material biológico de partida (Fig. 15). De hecho, al aumentar ésta, hemos obtenido proteínas que se adsorben directamente a la matriz (glucógeno fosforilasa y enzima ramificante en Fig. 15). Además, la recuperación de MBP-CP al final del protocolo es bastante pobre (Fig.15). Esto se debe en parte a que la elución con maltosa 10 mM, como propone el método original, es ineficiente (resultados no mostrados). Sin embargo, ésta no puede ser la única explicación puesto que la cantidad de proteína que queda retenida en la columna es muy baja con respecto a la cantidad de MBP-CP que se añade inicialmente (resultados no mostrados). Hemos observado que esto se debe a que la unión de MBP-CP a la resina de amilosa es muy poco eficiente y no depende de los lotes de proteína de fusión ni de resina comercial. De hecho, cuando se expresa MBP-CP en *E. coli* y se purifica usando la matriz de amilosa, más del 80% de la proteína eluida es incapaz de volverse a unir a la resina para realizar los experimentos de purificación de RNABPs (resultados no mostrados). Este efecto no pudo ser revertido aun dializando de forma extensiva la proteína purificada. Estos resultados son coherentes con trabajos estructurales sobre el mecanismo de acoplamiento MBP-maltosa (Millet y cols., 2003). Estos resultados sugieren la imposibilidad de llevar a cabo una aproximación de purificación de proteínas de unión a RNA a gran escala con estas limitaciones.

3.1.2. Generación de una MS2-coat-protein pura y funcional con dos etiquetas de afinidad.

Para superar este impedimento, hemos introducido una etiqueta de afinidad adicional en MBP-CP, una cola de His en el extremo N-terminal (Nt) de la MBP. La nueva proteína de fusión His-MBP-CP se expresa correctamente en *E. coli* y se obtiene una proteína de gran pureza al enriquecerla a partir del extracto bacteriano usando las dos matrices de afinidad (amilosa y Ni^{2+}) secuencialmente (Fig. 16A). En el eluido del primer paso de purificación se observan una serie de bandas de pesos moleculares diversos y en cantidades en absoluto despreciables que co-purifican con His-MBP-CP (ver carril amilosa en Fig. 16A). Obsérvese cómo éstas desaparecen totalmente tras el segundo paso de purificación en la columna de Ni^{2+} (Fig. 16A, dos últimos carriles).

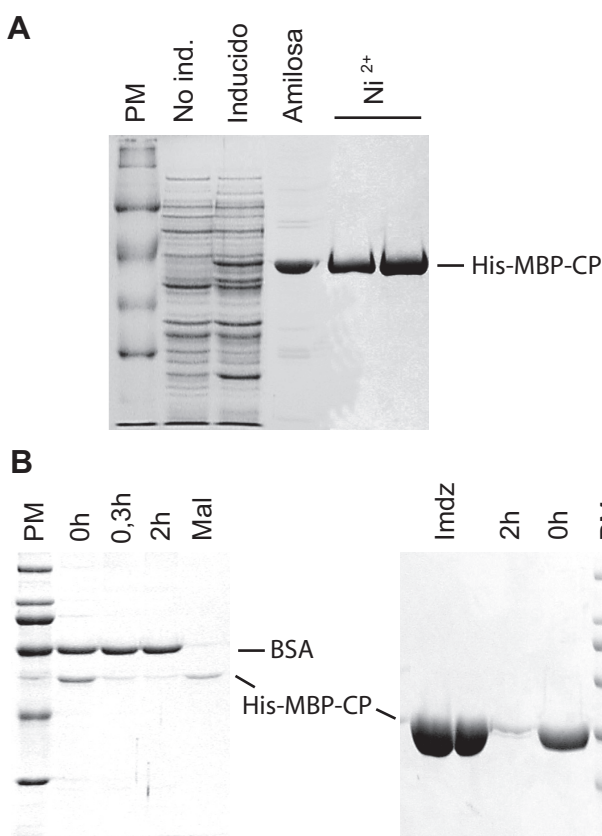


Figura 16: Expresión y purificación de His-MBP-CP. **A**, Expresión de His-MBP-CP en bacterias y doble purificación secuencial por afinidad. Inducción de la expresión de His-MBP-CP en *E. coli* BL21. Purificación en tandem de His-MBP-CP: primero, por afinidad con resina de amilosa a partir del extracto bacteriano, y después por afinidad a resina de Ni^{2+} partiendo de la elución de la primera afinidad. Se muestran alícuotas antes y después de la inducción, y de los eluidos de ambas columnas de afinidad. **B**, La proteína His-MBP-CP conserva la capacidad de unirse a las matrices de afinidad después de haber sido purificada. Se muestran los resultados de dos experimentos de unión entre la proteína purificada y la resina de amilosa (izquierda) y la de Ni^{2+} (derecha). En los geles se han cargado alícuotas del sobrenadante de la reacción de unión (la proteína que no está unida a la resina) a distintos tiempos y de las eluciones con maltosa (Mal) e imidazol (Imdz). En una de las reacciones (izquierda) se incluye una proteína como control que no presenta afinidad por la resina de amilosa (BSA).

Una vez comprobada la correcta expresión y purificación de esta proteína, lo relevante es su caracterización funcional en el contexto de la purificación de RNABPs. En primer lugar, es necesario confirmar que la His-MBP-CP pura ahora sí es capaz de unirse de nuevo a la resina, y determinar su cinética de unión. Como se observa en la Figura 16B, la proteína pura es plenamente capaz de unirse a la resina de Ni^{2+} y eluirse de ella eficientemente (Fig. 16B, gel de la derecha) y, sorprendentemente, recupera parcialmente su afinidad por la matriz de amilosa (Fig. 16B, gel de la izquierda). Para ambas resinas 2h es tiempo suficiente para llegar a saturación, mientras que una proteína irrelevante (BSA) no puede unirse durante esta incubación (Fig. 16B). Asimismo, estos experimentos nos han permitido establecer la capacidad empírica de unión de cada lote de resina para esta proteína (~ 5 nmol His-MBP-CP/ ml resina Ni^{2+} de media) de tal manera que es posible fijar la cantidad de proteína que se usa en cada experimento de purificación, asegurándonos la recuperación total de la misma al final del proceso.

En segundo lugar, es necesario establecer la cinética y estequiometría de la reacción entre His-MBP-CP y el hRNA (Fig. 17A). His-MBP-CP se une eficientemente a los hRNAs a bajas concentraciones mientras que no es capaz de formar complejos con una sonda del 3'UTR sin las horquillas MS2 (Fig. 17A, carriles 1 y 2). Como resultado de estos experimentos, hemos obtenido que tras 1h de incubación y

con una razón molar His-MBP-CP/hRNA ≈ 10 no se observa un incremento en la formación de complejos. Hay que destacar que en condiciones de exceso molar de la proteína de fusión, parece que ésta puede ocupar más de un sitio en el hRNA (Fig. 17A), dando lugar a la formación de complejos de una molécula de hRNA con una, dos o hasta 3 moléculas de proteína.

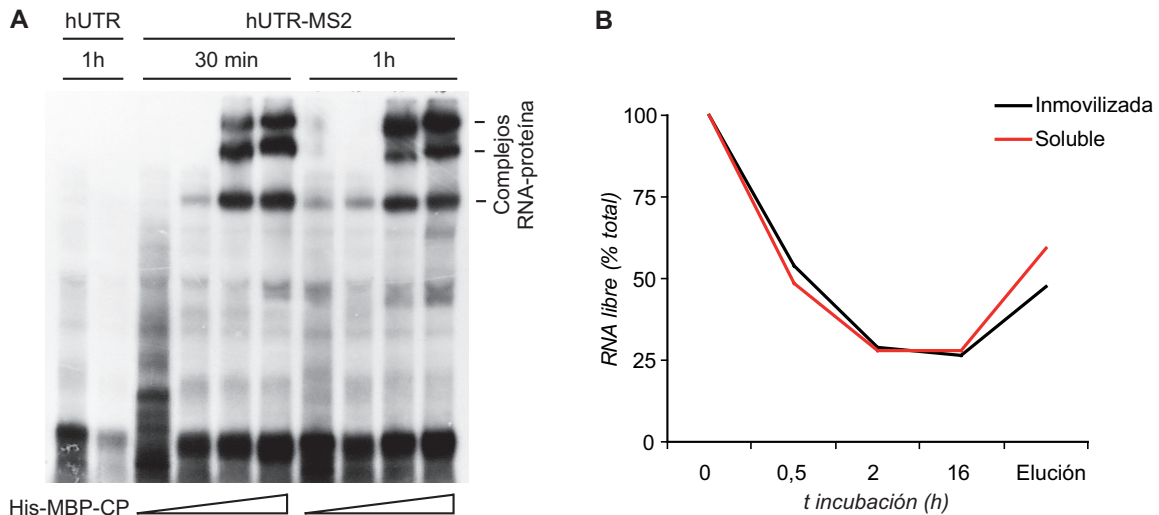


Figura 17: Caracterización de His-MBP-CP en la estrategia de purificación de RBPs. A, Estequiometría y cinética de la unión de His-MBP-CP a hRNAs. Se han realizado incubaciones de una cantidad fija de hRNA (hUTR-MS2 en este caso, 0,1 fmoles) con distintas cantidades de His-MBP-CP (10^{-2} , 10^{-1} , 10^0 , 10^1 pmoles) durante los tiempos indicados en la parte superior del panel. Posteriormente, se realiza una digestión con RNasa T1 y se fraccionan los complejos en condiciones nativas (EMSA). La interacción hRNA-proteína da lugar a 3 complejos de distinto tamaño que se señalan a la derecha del panel. Para demostrar la especificidad de la interacción de hRNA con His-MBP-CP, se realiza en paralelo el experimento con una sonda del 3'UTR de β -mRNA (hUTR) en la que no se observa la formación de complejos. **B,** La precipitación específica de complejos hRNA-His-MBP-CP se completa en menos de 2h y es igualmente eficiente con la proteína inmovilizada a la resina. His-MBP-CP inmovilizada en amilosa (línea negra) se incuba en exceso molar con una sonda de hRNA (hUTR-MS2) y se recogen muestras del sobrenadante a lo largo del tiempo (eje de abscisas). La cuantificación de la sonda no precipitada con la amilosa se realiza mediante conteo cerenkov y los resultados se refieren a la cuantificación a tiempo 0h de la incubación (%). Como control se lleva a cabo en paralelo la cinética de precipitación específica de complejos hRNA-His-MBP-CP preformados en solución (línea roja). Al final de la incubación se realiza una elución con maltosa que confirma la retención específica de la sonda en la matriz a través de la proteína.

En el protocolo original se añadía el hRNA sobre el extracto celular y se dejaba incubar; posteriormente se añadía la proteína y se dejaba incubar de nuevo; finalmente se añadía la resina y se dejaba una tercera incubación. Con el fin de reducir los tiempos de contacto del hRNA con el extracto donde es potencialmente accesible a la actividad de RNAsas celulares y dado que podemos controlar la cantidad de proteína que unimos previamente a la resina, hemos estudiado la posibilidad de introducir en el experimento de purificación el hRNA inmovilizado previamente a la proteína y a la resina. Para ello hay que comprobar que la

proteína inmovilizada en la resina conserva su afinidad por el hRNA y ver con qué eficiencia es capaz de secuestrarlo de la fase móvil. Como se ve en la Figura 17B, los complejos hRNA-His-MBP-CP previamente formados en solución se adsorben de forma eficiente a la matriz en menos de 2h (línea roja). Por otro lado, cuando se satura la resina con proteína de fusión y se incuba directamente con hRNA libre, éste es adsorbido a la matriz cubierta con la misma eficiencia (línea negra). En ambos casos, 16h de incubación no incrementa el rendimiento de la adsorción (Fig. 17B) y tras ésta, es posible eluir ~75% del hRNA de la resina por tratamiento con imidazol. Globalmente, estos resultados indican que hemos generado una His-MBP-CP de alto grado de pureza que se une específica y eficientemente a la resina y al hRNA, y hemos optimizado las condiciones de unión de cada uno de ellos, de tal manera que podemos acomplejar los 3 elementos de una manera reproducible antes de ponerlos en contacto con el material biológico de partida.

3.1.3. Bases de la interacción RNA-RNABPs.

Una vez determinadas las condiciones requeridas para acomplejar los elementos necesarios para la captura de las RNABPs, hay que determinar en qué condiciones se debe llevar a cabo la reacción de unión entre el RNA y el extracto proteico para optimizar el reclutamiento de las RNABPs al sistema de purificación. Con este objetivo hemos llevado a cabo ensayos de interacción *in vitro* RNA-proteína. En primer lugar hemos realizado experimentos de UVXL a distintos tiempos de incubación (Fig. 18A). En estos experimentos se observa un conjunto de proteínas que se unen específicamente al 3'UTR de β -mRNA (p80, p61, p57, p49, p42 y p40 en Fig. 18A) y que esta unión se compite eficientemente por la presencia de un exceso de RNA no marcado (Carril *Comp.* + en Fig. 18A). Por otro lado, 30 min es un tiempo de incubación suficiente para ver la formación de estos complejos y, aunque no mejora muy significativamente, al alargar este tiempo (2,5h de incubación) sí que se observa saturación (Fig. 18A). Además, en la Figura 18A se muestra que la región β 3 de β -mRNA, que se usa como hRNA control en los experimentos de purificación de RNABPs, no interacciona con ninguna proteína del extracto. Con estos experimentos hemos determinado el tiempo óptimo de incubación para el reclutamiento de un conjunto de RNABPs de peso molecular aparente conocido al RNA cebo y hemos confirmado la especificidad de este ensayo.

Por otro lado, es necesario conocer la cantidad de proteína total que debe contener el material biológico de partida para llevar a cabo la purificación de RNABPs. El

objetivo es establecer así la relación mg de proteína / nmol de RNA que promueve un desplazamiento óptimo de la sonda hacia la formación de complejos (Fig. 18B), para poder escalar después estas cantidades en los experimentos de purificación. Para ello, hemos llevado a cabo experimentos de interacción *in vitro* con una cantidad conocida de RNA y distintas cantidades de extracto (Fig. 18B). Para observar la separación de los complejos de la sonda libre, en estos experimentos no se realiza digestión de la sonda no acomplexada con RNasa T1 y la electroforesis se desarrolla en condiciones nativas (EMSA). Como se ve en la Figura 18B a medida que se incrementa la cantidad de extracto en la reacción de unión, la sonda se va desplazando progresivamente hasta desaparecer totalmente. A partir de estos resultados, hemos determinado que la relación óptima tendría que estar por encima de 100 mg de proteína total / 0,1 nmol de hRNA.

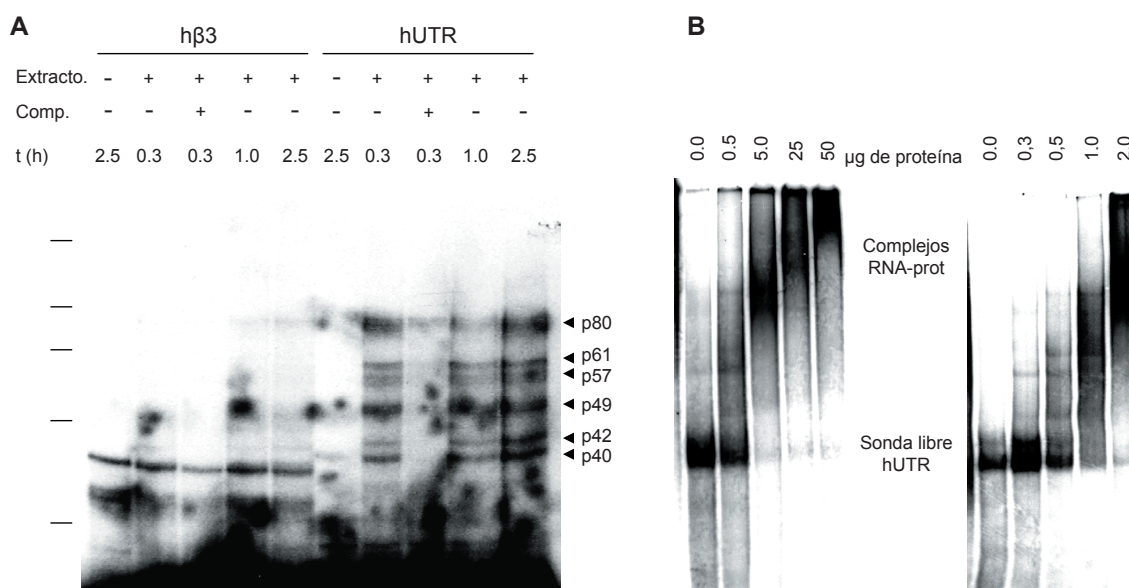


Figura 18: Caracterización de la interacción de las proteínas de unión a β-mRNA. **A,** Cinética de la reacción de unión entre el 3'UTR de β-mRNA y las proteínas de un extracto celular y determinación de sus pesos moleculares aparentes (P.M.). Se realizan ensayos UVXL (ver materiales y métodos) para determinar el P.M. de las proteínas que interaccionan con el 3'UTR de β-RNA. Éstas se indican a la derecha del panel y se les denomina por la letra p y el P.M. A la izquierda se muestra la movilidad de una mezcla de proteínas de P.M. conocidos (200, 97, 66, 45 y 30 kDa). En estos ensayos se usan sondas correspondientes a los hRNAs que se utilizan en la purificación como cebo (hUTR) y como control negativo (hβ3). Se varían los tiempos de incubación de la sonda con el extracto celular (parte superior) y en algunos casos se incluye un exceso molar de RNA sin marcar (comp. +). **B,** Estequiometría de la reacción de unión entre el 3'UTR de β-mRNA y las proteínas del extracto celular. Con objeto de estudiar el desplazamiento del RNA hacia la formación de complejos RNA-proteína y optimizar la proporción de cantidad de proteína del extracto respecto a la cantidad de RNA que promueve la máxima formación de complejos, se incubó una cantidad fija de sonda (hUTR, 1 fmol) con distintas cantidades de proteína celular (indicadas en la parte superior del panel) y se observa la formación de complejos por electroforesis en condiciones nativas. La movilidad de la sonda libre está indicada.

Resultados

3.1.4. La elución con RNAsa A.

Una vez controlados los puntos del protocolo susceptibles de variabilidad, hemos llevado a cabo una serie de experimentos de purificación de RNABPs. Sin embargo, a pesar de que se obtienen un buen número de proteínas y una recuperación excelente de His-MBP-CP, no se observan diferencias en el patrón de bandas obtenido con los distintos hRNAs (β -mRNA, hUTR y h β 3). Sorprendentemente, este patrón proteico se obtiene incluso cuando no se incluye hRNA en el ensayo (Fig. 19). Esta asociación inespecífica de proteínas podría estar produciéndose a través de la resina o de la His-MBP-CP. Hemos realizado un experimento de purificación en el que no se introduce hRNA alguno (Fig. 19) y se comparan los resultados cuando se incluye o no His-MBP-CP (Fig. 19). En estos experimentos se han realizado dos eluciones secuenciales de la columna: una con maltosa, para identificar los contaminantes que aparecen en la elución específica, y otra con hidrocloreuro de guanidinio (*Gu-HCl* en Fig.19), que es un agente desnaturante potente que promueve la liberación de todo el material que pudiera quedar adsorbido en la columna. Los resultados muestran claramente que His-MBP-CP *per se* puede unir multitud de proteínas del extracto celular en las condiciones experimentales ensayadas independientemente de la presencia del hRNA.

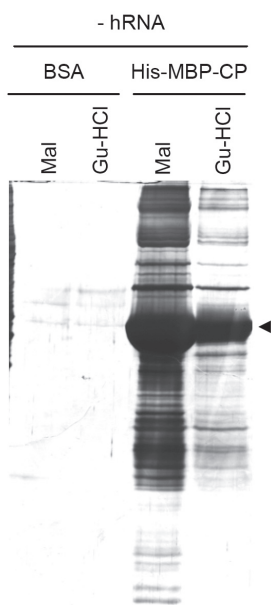


Figura 19: His-MBP-CP interacciona inespecíficamente con multitud de proteínas celulares. El gel muestra el resultado de dos purificaciones de RNABPs en las que no se ha incluido hRNA (-hRNA). Para analizar a qué elemento de la estrategia de purificación se unen inespecíficamente las proteínas contaminantes (Resina o His-MBP-CP), las purificaciones se realizan en presencia (His-MBP-CP) o ausencia (BSA) de la proteína de fusión. En esta última se añade la misma cantidad de una proteína que no presenta afinidad por la resina (BSA, fig. 16). En el gel se analizan las proteínas que se eluyen consecutivamente con maltosa (Mal) y con el agente caotrópico hidrocloreuro de guanidinio (Gu-HCl).

Para superar esta dificultad hemos trabajado en el efecto de incrementar la astringencia de las condiciones de unión aumentando la fuerza iónica, incluyendo detergentes e incluso urea a distintas concentraciones. Desgraciadamente, las condiciones ensayadas afectan diferencialmente a la interacción RNA-RNABPs y/o MBP-amilosa (resultados no mostrados), no consiguiendo un equilibrio entre el rendimiento del proceso y la eliminación de contaminantes.

En este punto, hemos decidido cambiar las condiciones de elución y hemos implementado un paso de elución basado en la digestión del hRNA con RNasa A, de manera que se liberan específicamente las RNABPs que están unidas al hRNA cebo promoviendo una mínima elución de His-MBP-CP con todos sus contaminantes asociados. Al introducir este paso y dado que la amilosa, y en menor grado la resina de Ni^{2+} , une ácidos nucleicos de forma inespecífica (Jurica y cols., 2002), es necesario evitar la adsorción inespecífica de RNAs celulares mediante el bloqueo de la resina con un poli-anión (DNA de espermatozoos de salmón; secc. 2.3.5 de Material y métodos). Sin embargo, es importante destacar que para este fin no es recomendable el uso de tRNA de *S. cerevisiae* (muy ampliamente usado como competidor inespecífico y como estabilizador del RNA) ya que podría reclutar ciertas proteínas del extracto que se eluirían con el tratamiento de RNasa dando lugar a falsos positivos.

3.1.5. Esquema de la estrategia experimental.

Superadas las limitaciones de la técnica y una vez puesto a punto el sistema de purificación, el protocolo que se ha seguido para la identificación de las RNABPs de β -mRNA está esquemáticamente representado en la Figura 20. Típicamente, se satura la resina de Ni^{2+} con His-MBP-CP y, una vez lavada, se cuantifica la cantidad que tiene adsorbida. Para cada purificación se incuban 1 nmol del His-MBP-CP inmovilizada en la resina con 0,1 nmoles de cada hRNA durante 2h. Posteriormente, esa resina se lava y se añade sobre un extracto celular que contiene un mínimo de 10 mg de proteína total, dejándose incubarlo durante 2h (Fig. 20). Finalmente la resina se lava y se eluye primero con RNasa A y posteriormente con maltosa (Fig. 20). Las fracciones obtenidas se analizan por electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) y las bandas presentes en los carriles correspondientes a las purificaciones realizadas con hUTR-MS2 y/o β -mRNA-MS2 diferenciales respecto a los carriles control (h β 3-MS2 y sin RNA) se secuencian por MALDI-TOF (Fig. 20). En la secc. 2.3.5 de Material y métodos se puede encontrar una descripción más detallada sobre el protocolo.

3.2. Purificación e identificación de las β -mRNABPs.

3.2.1. Purificación e identificación de las β -mRNABPs.

En la Figura 21A se muestra el análisis de un experimento típico de purificación de RNABPs. En el gel que se muestra en la figura se analizan en paralelo las eluciones con RNasa A (R) y con maltosa (M) de un experimento en el que se

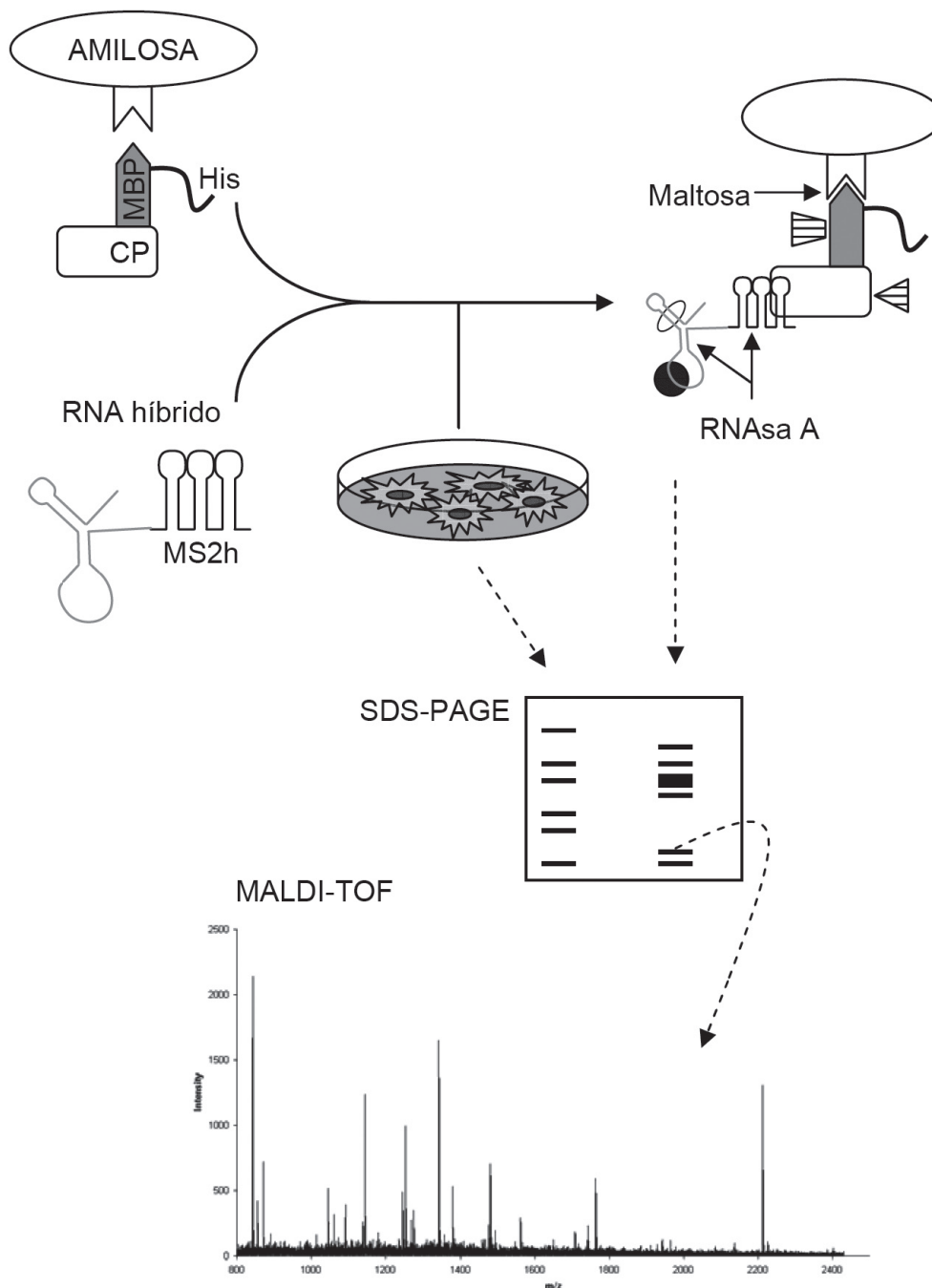


Figura 20: Esquema de la estrategia de purificación de las proteínas celulares que se unen a β -mRNA. En primer lugar se incubó la resina de afinidad (amilosa o Ni^{2+}) con cantidades saturantes de His-MBP-CP pura, se lava y se cuantifica la cantidad de proteína adsorbida por cada ml de resina (arriba y a la izquierda; ver fig. 16). Posteriormente, se incubó la resina con la proteína inmovilizada con el RNA híbrido transcrito *in vitro* y purificado en la relación molar y durante el tiempo óptimo para maximizar la formación de complejos (ver fig. 17A y B). La resina con los complejos hRNA-His-MBP-CP inmovilizados se incubó con un extracto celular (placa en el centro del esquema; fig. 17). Durante esta incubación el hRNA reclutará proteínas que se unen específicamente (círculo negro y elipse blanca; ver fig. 18) y la His-MBP-CP proteínas inespecíficas (triángulo y trapecio rayados; ver fig.19). A continuación se llevan a cabo dos eluciones consecutivas con RNasa A y con maltosa. Las proteínas que se eluyen, así como una alícuota del extracto celular de partida (flechas rectas) se analizan por electroforesis (SDS-PAGE, ver fig. 21) y las bandas diferenciales se recortan del gel (flecha curva) para su posterior identificación por MALDI-TOF (ver material suplementario A1 en anexo I).

han incluido el hRNA que contiene β -mRNA, el que contiene h β 3 como control y un control negativo el que no se ha incluido hRNA (- RNA). La comparación de los patrones de bandas que se obtienen en las purificaciones con β -mRNA-MS2 con respecto a las que se obtienen en las de β 3-MS2 o -RNA indica la presencia de algunas bandas específicas de β -mRNA, algunas otras claramente enriquecidas y otras que son comunes a todos los carriles (Fig. 21A). Se han seleccionado para identificar aquéllas que son inequívocamente específicas, es decir, que están en el carril de β -mRNA y no en los carriles correspondientes a β 3 o -RNA. En ocasiones, hemos escogido bandas que estaban claramente enriquecidas; en estos casos, la banda equivalente del carril control también ha sido llevada a secuenciar, aunque en ningún caso hemos encontrado coincidencia en la identificación de las proteínas. En la Figura 21B se muestra un carril de un gel donde se han resuelto las proteínas procedentes de la elución con RNAsa de una purificación usando como hRNA β -mRNA-MS2, señalándose las bandas seleccionadas para su identificación por MALDI-TOF y las proteínas identificadas (Material suplementario A1 en Anexo I).

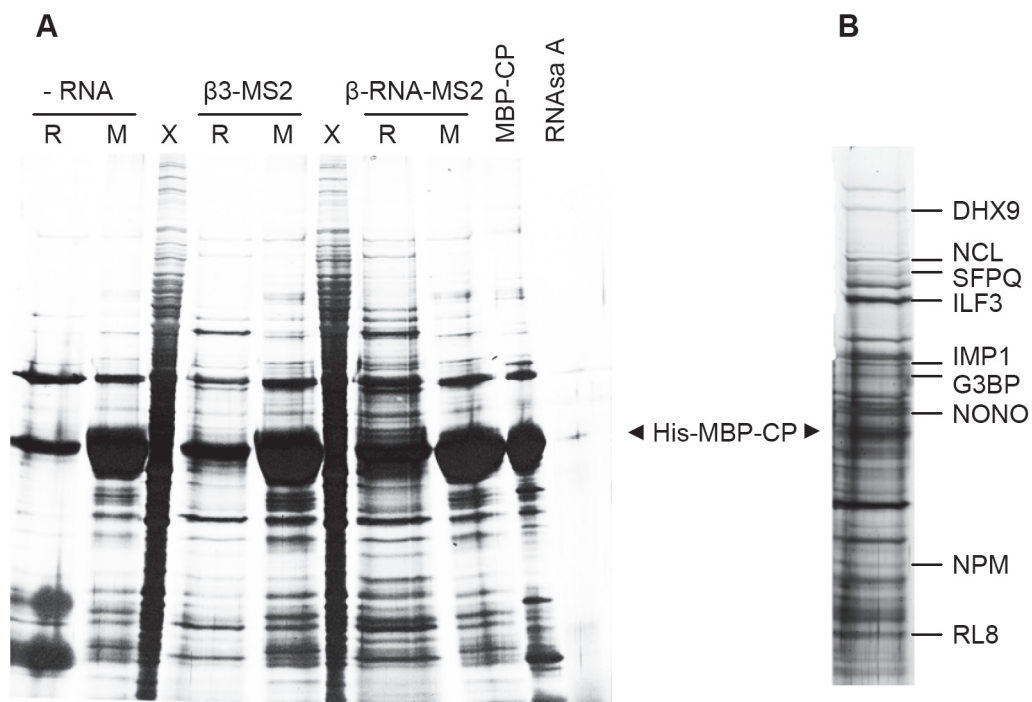


Figura 21: Purificación e identificación de las proteínas que se unen a β -mRNA. **A**, Resultado de un experimento de purificación representativo. El gel muestra los patrones proteicos de las eluciones con RNAsa A (R) y con maltosa (M) de 3 purificaciones de RBPs realizadas en paralelo con el hRNA cebo (β -mRNA-MS2), con el hRNA control (β 3-MS2) y sin hRNA. Además se han analizado en paralelo los patrones del extracto de partida, de la His-MBP-CP y de la RNAsa A. **B**, Patrón proteico que se ha obtenido de la elución con RNAsa A de un experimento de purificación con el hRNA cebo β -RNA-MS2. Las bandas específicamente enriquecidas con respecto a los controles y que han podido ser identificadas se indican a la derecha del carril, así como sus identidades según la denominación corte de la base de datos Swiss-Prot (<http://expasy.org/sprot/>). La movilidad relativa de la His MBP-CP se indica en ambos geles.

Resultados

En la Tabla 4 se muestra de forma resumida una lista de las RNABPs específicas que hemos identificado. Para la identificación de cada proteína se ha realizado primero MALDI-TOF, y cuando el análisis del espectro muestra más de 10 péptidos coincidentes, hemos dado por buena la identificación. En la Tabla 4 se muestra también el porcentaje de secuencia que cubren las masas identificadas. Si el número de péptidos coincidentes es menor de 10 se ha procedido a la secuenciación de uno o dos de ellos por MS/MS para confirmar la identidad de la proteína (material suplementario A1 en anexo I).

3.2.2. Funcionalidad de las β -mRNABPs en la expresión de β -mRNA.

A continuación hemos querido confirmar la funcionalidad de las β -mRNABPs que hemos identificado mediante métodos bioquímicos en la interacción y/o expresión de β -mRNA. De los candidatos que figuran en la Tabla 4 hemos seleccionado,

Nº de acceso	Nombre de la proteína	PM	Péptidos	Cobertura secuencia	Mascot Score
gi 56206329	ATP-dependent RNA helicase A	140	12	12	168
gi 38014635	Splicing factor proline/glutamine-rich (SFPQ)	100	9	MS/MS	195
gi 55663416	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	54	14	33	230
gi 189306	Nucleolin	76.5	13	19	189
gi 825671	Nucleophosmin	33	3	MS/MS	128
gi 12746295	Interleukin enhancer-binding factor 3 (ILF3)	90	17	28	220
gi 80478622	Ras-GTPase-activating protein-binding protein 1	52	4	MS/MS	103
gi 56237027	IMP1	64	11	22	162
gi 15341853	Ribosomal protein L8 (Homo sapiens)	28	8	MS/MS	143

Tabla 4: Resumen de las proteínas celulares identificadas que se unen específicamente a β -mRNA. En la tabla se muestra la referencia (nº de acceso) y nombre completo de la proteína según la denominación de la base de datos Protein del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) así como su peso molecular teórico (PM) predicho a partir de su secuencia de aminoácidos. *Péptidos* se refiere al número de péptidos de la digestión con tripsina de la muestra cuya masa coincide con la de péptidos de la colección asignada a esa proteína a partir de su digestión teórica. *Cobertura de secuencia* es el porcentaje de la secuencia de la proteína que queda cubierta por los péptidos coincidentes identificados. Cuando el número de péptidos identificados es menor de 10 se secuencian uno o dos de ellos mediante HPLC-MS/MS. El *Mascot score* es una medida de la probabilidad de que la coincidencia de las masas de los péptidos de la muestra con la de la colección asignada a la proteína identificada sea azarosa. Matemáticamente, este valor se calcula como $S = -10 \cdot \log(P)$, siendo P la probabilidad de que la coincidencia entre las masas de los péptidos se produzca por azar. La significatividad de estos resultados depende del tamaño de la base de datos y el motor de búsqueda Mascot establece un punto de corte en $P = 0,05$, que equivale aproximadamente a un Mascot Score = 70.

según la información disponible en la literatura (ver Material suplementario A2 en anexo I), a tres de ellos basándonos en los siguientes criterios. (i) Que las proteínas puedan localizarse tanto en el núcleo como en el citoplasma, ya que resultados previos del laboratorio sugieren que la RNP que localiza β -mRNA en hepatocitos de rata se forma en el núcleo y luego se exporta al citoplasma (Egea y cols., 1997), (ii) que los pesos moleculares aparentes de las proteínas estén en el rango de las mayoritarias que interaccionan con β -mRNA (ver Figura 18A) y (iii) que las proteínas identificadas se hayan relacionado con procesos tumorales y/o se haya destacado su relevancia en cáncer. En suma, finalmente hemos seleccionado tres RNABPs de la Tabla 4 que satisfacen estos criterios: nucleofosmina (NPM), G3BP e IMP-1.

En primer lugar, hemos intentado reconstruir la interacción *in vitro*. Para ello hemos sintetizado *in vitro* en un sistema eucariota de lisado de reticulocitos las tres proteínas en presencia de ^{35}S -met (Fig. 22A) además de otra proteína irrelevante usada como control (PK en Fig. 22A); por otro lado hemos sintetizado *in vitro* con la T7 RNA polimerasa β -mRNA. Finalmente, hemos estudiado la formación de complejos reproduciendo las condiciones de unión usadas en la purificación. En estos experimentos, que hemos realizado en colaboración con Sandra Sala, se

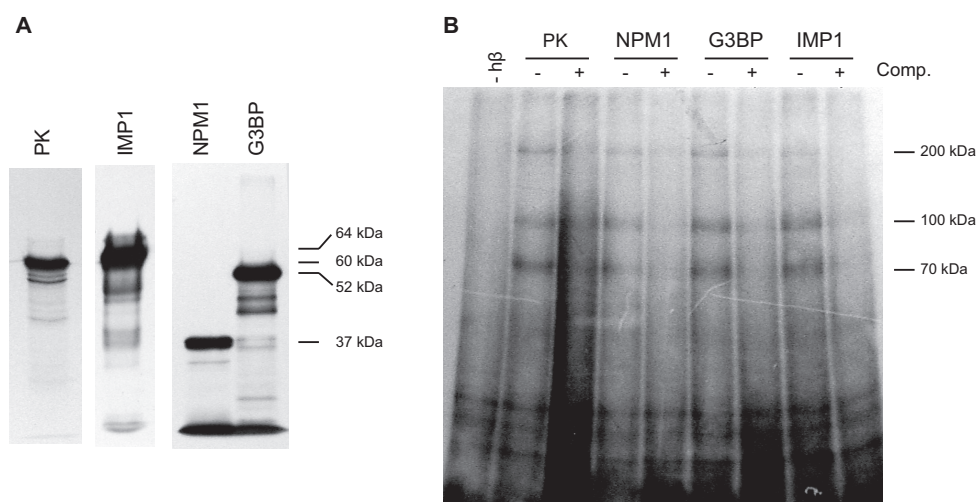


Figura 22: Interacción *in vitro* de β -mRNA y RBPs. **A**, Síntesis *in vitro* de algunas de las RNABPs identificadas en un sistema eucariota de transcripción y traducción acopladas. En la reacción que se muestra se ha incluido ^{35}S -Met con objeto de visualizar el producto sintetizado por SDS-PAGE y fluorografía. Se indica la movilidad electroforética relativa (kDa) de los productos. **B**, La inclusión de las RNABPs (sintetizadas como se indica en **A** pero sin marcaje isotópico) en ensayos de UVXL no altera el patrón ni la intensidad de las bandas que se unen a β -mRNA. En algunos experimentos se incluye un exceso de β -mRNA sin marcar (Comp.) para identificar la especificidad de las bandas. Se indica la movilidad electroforética relativa (kDa) de las bandas que interaccionan específicamente con β -mRNA.

Resultados

incuba β -mRNA marcado con ^{32}P -UTP con la RNABP no marcada, se induce el entrecruzamiento covalente RNA-proteína por irradiación ultravioleta y se digiere el RNA que no está en contacto directo con la proteína mediante la RNasa T1 (Fig. 22B). No se observan variaciones en el patrón de bandas que se unen a la sonda ni en la intensidad de estas bandas cuando en las incubaciones se incluyen las RNABPs sintetizadas (Fig. 22B). Dado que el marcaje de la sonda afecta exclusivamente a las uridinas, sólo se identifican aquellas proteínas que se unen al RNA a través de regiones ricas en U. Esto sugiere que con este método podemos estar ignorando la interacción de RNABPs con secuencias de RNA que no contengan U. Con el fin de descartar esta posibilidad, hemos reproducido los experimentos anteriores pero con las RNABPs marcadas con ^{35}S -met (Fig. 22A) y un exceso de RNA no marcado (Fig. 23). La formación de complejos se analiza por cromatografía de filtración molecular (Fig.23). Como se observa en la Figura 23, el RNA marcado con ^{32}P sale mayoritariamente en el volumen de exclusión (línea gris), mientras que las proteínas marcadas se resuelven en fracciones intermedias (líneas verdes). Sin embargo, la incubación de las proteínas marcadas

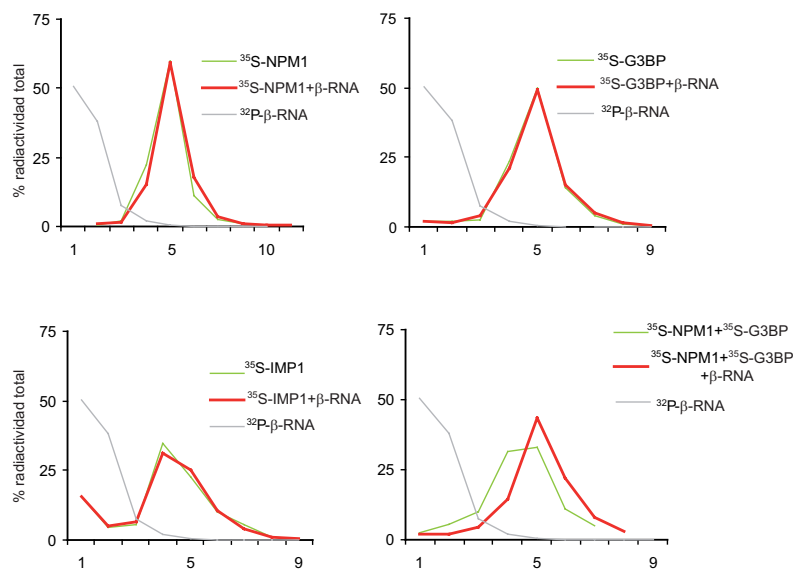


Figura 23: No hay evidencias de interacción *in vitro* de algunas de las proteínas identificadas con β -mRNA. NPM1, G3BP e IMP1 se sintetizan en un sistema eucariota de transcripción y traducción acopladas en presencia de ^{35}S -met. Por otro lado, se sintetiza β -mRNA *in vitro* con la RNA polimerasa del fago T7 así como una sonda del mismo RNA marcado con ^{32}P . Se ponen a incubar entonces cada proteína con un exceso de β -mRNA en las mismas condiciones en que fueron purificadas. A continuación se fracciona la reacción en una columna de filtración molecular Sephacryl S-200 (línea roja). El patrón de fraccionamiento de la proteína libre (línea verde) y de β -mRNA (línea gris) se analiza previamente. Asimismo se analiza la interacción *in vitro* cuando se juntan dos de estas proteínas (NPM1 y G3BP) con β -mRNA.

con un exceso de RNA sin marcar no promueve el desplazamiento de la marca radiactiva al volumen de exclusión (Fig. 23), lo que indica que en estas condiciones experimentales no somos capaces de reconstruir la interacción entre la proteína y el RNA sintetizados *in vitro*. Ni siquiera mezclando dos de estas proteínas hemos sido capaces de detectar formación de complejos (Fig. 23).

Dado que no tenemos evidencias de interacción directa entre RNA y proteína sintetizados *in vitro*, nos hemos planteado la posibilidad de que la formación de estos complejos requiera la asistencia de otros factores. En este sentido, hemos realizado un ensayo funcional para poner de manifiesto si estas proteínas ejercen algún papel en la regulación de la traducción de β -mRNA. En estos experimentos, hemos incluido las RNABPs sintetizadas *in vitro* (Fig. 22A) en un sistema eucariota de lisado de reticulocitos con los componentes necesarios para llevar a cabo la traducción de β -mRNA transcrito *in vitro* (Fig. 24A). Como se puede apreciar, G3BP, IMP1 y NPM inhiben claramente la traducción de β -mRNA cuando se compara con el efecto de PK u otros componentes del sistema de transcripción-traducción acoplados (Φ) (Fig. 24A y B) que se usa para la síntesis de las RNABPs. De hecho, la inclusión de estas proteínas en el ensayo de traducción *in vitro* promueve una inhibición significativa de hasta un 80% la traducción de β -mRNA (Fig. 24B).

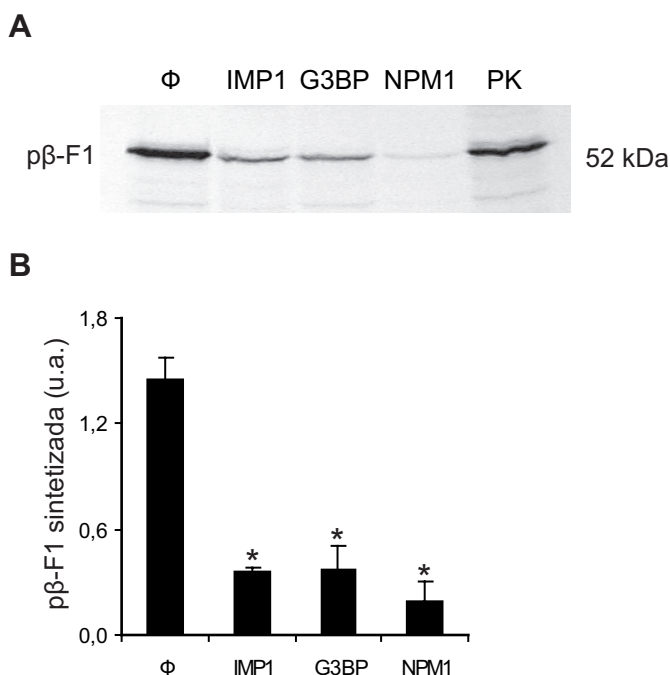


Figura 24: Traducción *in vitro* de β -mRNA en presencia de las RBPs.

A, 100 ng de β -mRNA transcrito *in vitro* se traducen con un sistema eucariótico de lisado de reticulocitos en presencia de 35 S-Met. En las reacciones se incluyen las RNABPs sintetizadas *in vitro* (ver fig. 22A). Φ es una traducción que no incluye ninguna RNABP (se ha añadido la misma cantidad de una reacción de síntesis *in vitro*, ver fig. 22A, en la que no se incluyó plásmido). **B**, Cuantificación del efecto que ejercen las distintas RBPs sobre la traducción *in vitro* de β -F1-ATPasa. La densitometría de los productos sintetizados en presencia de las distintas RNABPs se normalizan respecto a la del control en presencia de PK. Los resultados son la media \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes. *, $P \leq 0,05$, cuando se comparan frente al control Φ usando la prueba t de Student.

Resultados

Con objeto de determinar la relevancia fisiológica en el contexto celular de la inhibición traduccional de β -mRNA que se observa en el sistema *in vitro*, hemos llevado a cabo experimentos de sobre-expresión de las β -mRNABPs y hemos estudiado su efecto sobre la velocidad de síntesis *in vivo* de β -F1-ATPasa endógena (Fig. 25). Para ello, se realiza un marcaje metabólico de las proteínas sintetizadas durante 30 min con ^{35}S -Met en células que sobre-expresan NPM, G3BP, IMP-1 y β -galactosidasa (como control), y se inmunoprecipitan β -F1-ATPasa y otra

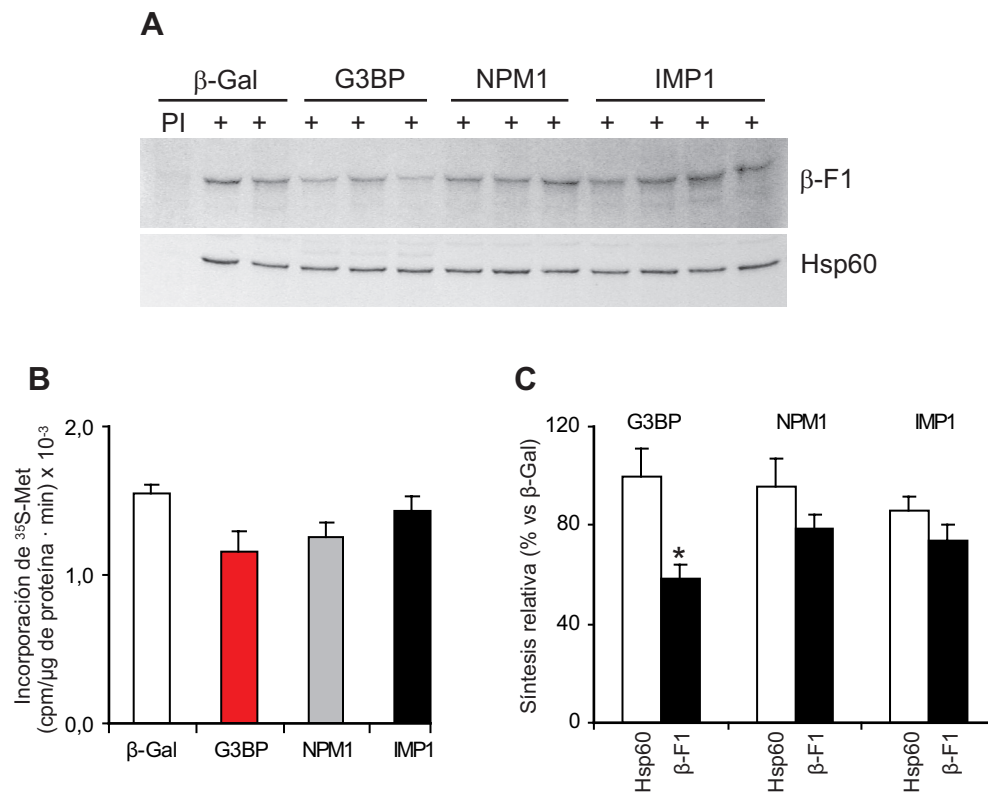


Figura 25: Efecto de la sobre-expresión de las proteínas identificadas en la síntesis *in vivo* de β -mRNA. **A**, Análisis de la síntesis *in vivo* de β -F1-ATPasa. Se realiza un marcaje metabólico (^{35}S -met) de las proteínas de células HEK transfectadas transitoriamente con las proteínas que se indican en la parte superior de los paneles. A continuación se inmunoprecipitan β -F1-ATPasa y Hsp60, y se visualiza la proteína sintetizada durante el marcaje. En el primer carril se muestran los inmunoprecipitados con suero pre-inmune (panel superior) e IgGs de ratón (panel inferior) **B**, La sobre-expresión de las proteínas identificadas no influyen en la síntesis global de proteínas celulares. La velocidad de síntesis global de proteínas celulares se valora mediante la cuantificación de la incorporación de ^{35}S -met durante el tiempo del marcaje a la proteína precipitable por ácido tri-Cl-acético. En el histograma se representan los datos normalizados respecto a la cantidad de proteína total de las células. Los resultados son la media \pm S.E.M. de cuatro experimentos independientes. **C**, La cuantificación de la síntesis relativa de β -F1 (barras negras) y Hsp60 (barras blancas) se realiza por densitometría de las bandas. En el histograma se presentan los valores de síntesis de las células transfectadas con las construcciones indicadas en la parte superior y normalizados respecto a la media obtenida para las células que sobre-expresan β -Gal. Los resultados son la media \pm S.E.M. de 5 experimentos independientes. *, $P \leq 0,05$ cuando se comparan los valores de síntesis frente a los que se obtienen en células transfectadas con β -Gal mediante la prueba de la t de Student.

proteína mitocondrial que nos sirve de control (Hsp60) (Fig. 25A). La síntesis global de proteínas, medida por la incorporación de ^{35}S -Met en proteína celular total, no experimenta variaciones significativas cuando se sobre-expresan las distintas β -mRNABPs (Fig. 25B). La cantidad de β -F1-ATPasa y Hsp60 sintetizadas durante ese periodo en las células que sobre-expresan las β -mRNABPs se inmunoprecipita, se cuantifica y se refiere respecto de la que se ha sintetizado en las células que sobre-expresan β -galactosidasa (Fig. 25C). La síntesis *in vivo* de β -F1-ATPasa experimenta una disminución en todos los casos, aunque en las células que sobre-expresan G3BP ésta es altamente significativa (Fig. 25C). Por el contrario, y coherentemente con los datos de síntesis global (Fig. 25B), Hsp60 no experimenta variaciones significativas respecto al control en ninguno de los tres casos (Fig. 25C).

G3BP es una proteína que se ha identificado en gránulos de estrés y en cuerpos de procesamiento, que son lugares donde se acumulan mRNAs silenciados traduccionalmente y de donde pueden ser redirigidos para su degradación (Kedersha y cols., 2005). Por tanto, con objeto de saber si el efecto específico observado en la síntesis de β -F1-ATPasa viene causado por una desestabilización de su mensajero o por inhibición de su traducción, hemos llevado a cabo la cuantificación relativa de los niveles estacionarios del β -mRNA en las células que sobre-expresan las β -mRNABPs (Fig. 26). Los resultados no muestran diferencias significativas de los niveles de β -mRNA cuando se sobre-expresa G3BP o NPM (Fig. 26), lo que indica que el efecto de la sobre-expresión de G3BP en la síntesis *in vivo* de β -F1-ATPasa no se debe a diferencias en la cantidad de su mRNA. Estos datos sugieren que la sobre-expresión de G3BP promueve una inhibición específica de la traducción de β -mRNA. Por el contrario, se observa un aumento significativo de la representación de β -mRNA en células que sobre-expresan IMP1, lo que puede sugerir la participación de esta β -mRNABP en el control de la estabilidad de β -mRNA.

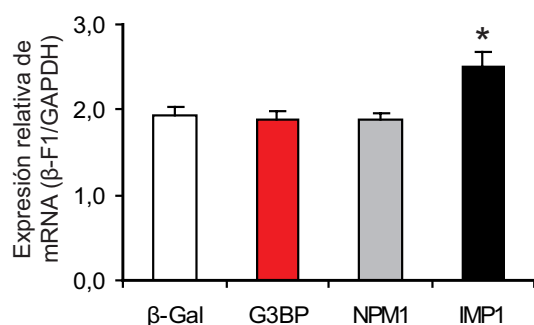


Figura 26: Efecto de la sobre-expresión de las β -mRNABPs en los niveles de β -mRNA. La sobre-expresión de las proteínas identificadas no promueven cambios relevantes en los niveles estacionarios de β -mRNA. La cuantificación de β -RNA se lleva a cabo por RT-qPCR, usando células no transfectadas como muestra calibradora y GAPDH como gen de referencia. Los resultados son la media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes. *, $P \leq 0,05$ cuando se comparan los niveles de RNA frente a los que se obtienen en células transfectadas con β -Gal mediante la prueba de la t de Student.

4. Modelos celulares de represión de la función bioenergética de la mitocondria.

4.1. Modelo celular de inhibición funcional de la actividad de la H^+ -ATP-sintasa: sobre-expresión del inhibidor fisiológico IF1.

En la sección 1.2.2 de Resultados hemos demostrado que la huella bioenergética representa la alteración funcional del fenotipo bioenergético de las células del tumor y está asociado con la progresión del cáncer. Con estos antecedentes, uno de los objetivos del laboratorio es determinar si la alteración del fenotipo bioenergético de la célula puede predisponer a la generación de tumores. Para ello, hemos elaborado un modelo celular de inhibición funcional de la H^+ -ATP-sintasa. En este modelo, se ha sobre-expresado el inhibidor fisiológico de la actividad ATPasa de la H^+ -ATP-sintasa y un mutante puntual (H49K) del mismo (Cabezón y cols., 2000). Este mutante es insensible a la regulación fisiológica de la actividad inhibidora por pH, lo que supone la expresión de un polipéptido inhibidor de la H^+ -ATP-sintasa que está constitutivamente activo.

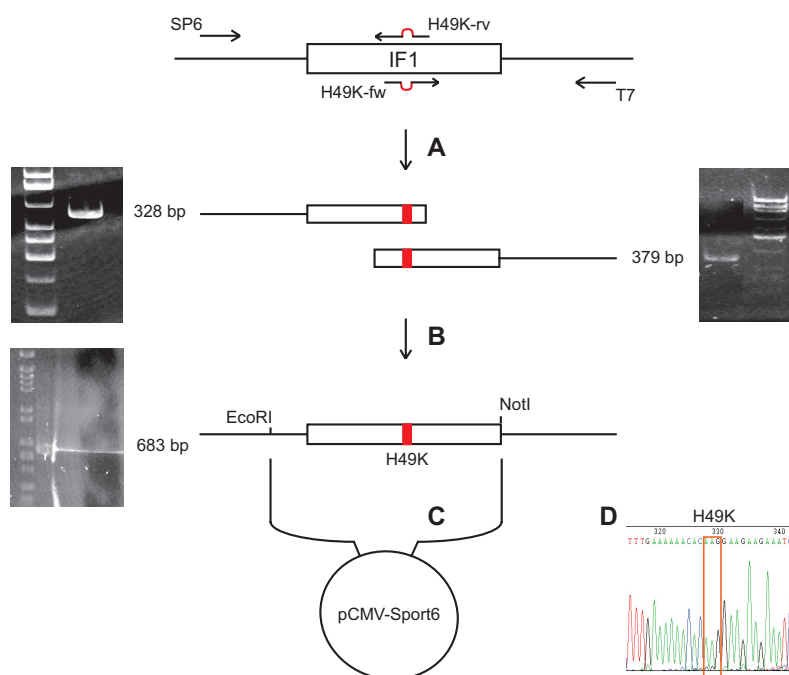


Figura 27: Clonaje del mutante de IF1 H49K: **A**, A partir del clon humano de IF1 se amplifican dos fragmentos solapantes que integran la mutación gracias al uso de oligos mutagénicos orientados en sentido inverso (H49-fw y H49-Rv) y oligos externos (T7 y SP6). **B**, Los fragmentos mutagénicos solapantes (328 y 379 bp) se usan como cebadores y moldes en una reacción de anillamiento y extensión que se amplifica posteriormente usando los oligos externos (683 bp). **C**, El amplicón generado incluye dos dianas de restricción (EcoRI y NotI) externas al gen que se usan para subclonar la construcción en un vector de expresión eucariota (pCMV-Sport6). **D**, Los clones positivos se analizan por secuenciación completa confirmándose la integración de la mutación H49K.

La generación del mutante puntual se ha llevado a cabo por técnicas habituales. Usando como molde el clon de IF1 humano (ATPIF1, cDNA ID NM_016311; Origene, Rockville, MD, EE.UU.) se han llevado a cabo 2 PCRs que generan dos fragmentos solapantes que han integrado la mutación (Fig. 27A). Estas PCRs se realizan con dos oligos centrales mutagénicos en orientación inversa (H49-fw y H49-Rv) y dos oligos externos (T7 y SP6 en Fig. 27A). Los fragmentos solapantes se juntan y sirven como molde y cebadores para su extensión (Fig. 27B). El producto se amplifica con oligos externos y el amplicón se subclona en un vector de expresión eucariota (Fig. 27C). Finalmente, los clones positivos se secuencian completamente para corroborar la inserción de la mutación (Fig. 27D).

4.1.1. Relevancia del metabolismo energético mitocondrial en células en cultivo.

Con objeto de explorar el efecto de la expresión de IF1 y su forma mutante en células en cultivo, en primer lugar hemos seleccionado aquellas líneas celulares que tengan dependencia de la fosforilación oxidativa como vía de obtención de energía metabólica. Para realizar esta selección, hemos estudiado el efecto de la oligomicina (un inhibidor específico de la H^+ -ATP-sintasa) sobre el flujo glucolítico en diversas líneas celulares analizando la producción de lactato. En células HEK no observamos un aumento significativo de la glucólisis aerobia en presencia de oligomicina (datos no mostrados). Por el contrario, la oligomicina estimula muy significativamente el flujo glucolítico basal de células NRK (Fig.28A y B).

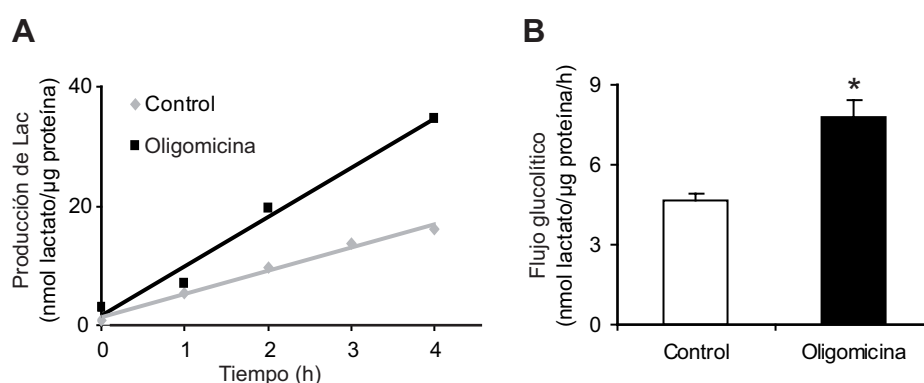


Figura 28: Relevancia del metabolismo energético mitocondrial en células NRK. **A**, Medida de la producción de lactato en células NRK a lo largo del tiempo tratadas con oligomicina 6 μ M (negro) y en células sin tratar (control; gris). **B**, Flujo glucolítico aeróbico en células NRK en presencia (barra negra) o ausencia (barra blanca) de oligomicina. Los resultados representan la media \pm S.E.M. de cinco experimentos independientes. *, $P \leq 0,05$ cuando se compara el flujo glucolítico con respecto a células no tratadas mediante la prueba t de Student.

La producción de lactato en las células es lineal en función del tiempo tanto en ausencia como en presencia de oligomicina (Fig 28A). Estos resultados indican que las células NRK presentan dependencia de la fosforilación oxidativa como vía de obtención de energía metabólica puesto que la inhibición de la H⁺-ATP-sintasa produce un aumento del flujo glucolítico.

4.1.2. La sobre-expresión de IF1 y H49K provoca un aumento del flujo glucolítico de las células.

Una vez comprobado que las células NRK son dependientes de la función bioenergética de la mitocondria, hemos transfectado estas células con IF1, H49K o pcDNA, con objeto de estudiar el efecto de la sobre-expresión de estas proteínas en el metabolismo energético celular. La sobre-expresión de ambas proteínas se ha verificado por *western blot* (Fig. 29A). La expresión de GAPDH se muestra como control de carga del gel (Fig 29A). Como se puede observar en la Fig. 29B, la sobre-expresión de IF1 y H49K en células NRK produce un aumento muy significativo (~ 80%) del flujo glucolítico cuando se compara con las células control transfectadas con un plásmido vacío (pcDNA; Fig. 29B). Hay que destacar que la transfección de las células *per se* reduce significativamente el flujo glucolítico basal de las células (comparar Fig. 28B frente a Fig. 29A), un efecto que quizás sea debido a la toxicidad de los agentes empleados como transfectantes.

4.1.3. Efecto de la sobre-expresión de IF1 y H49K en el potencial de membrana de la mitocondria.

El aumento del flujo glucolítico es una respuesta celular ante una situación de disfunción mitocondrial. En este punto hemos querido verificar que efectivamente se produce una alteración del fenotipo mitocondrial por la sobre-expresión de estas proteínas. Con este objetivo, hemos analizado el efecto de la sobre-expresión de IF1 y H49K sobre el potencial de membrana de la mitocondria de células NRK por citometría de flujo (Fig. 29C). En estos experimentos, junto con IF1, H49K o pcDNA hemos co-transfectado un plásmido 10 veces más diluido que expresa GFP, de tal forma que nos sirve como marcador de células transfectadas. Esto nos ha permitido realizar la cuantificación de $\Delta\Psi_m$ tanto de las células que expresan GFP como del conjunto de las células. En la Figura 29C se han resumido los datos obtenidos de células “verdes” a los que se les ha restado el valor de fluorescencia en presencia de FCCP (un agente desacoplante) con objeto ver específicamente los cambios atribuibles a $\Delta\Psi_m$ por la acción de los inhibidores. La sobre-expresión

de IF1 y H49K en células NRK promueve un aumento de $\Delta\Psi_m$ cuando se compara con células transfectadas con pcDNA (Fig. 29C). Por lo tanto, estos resultados indican que la inhibición específica (farmacológica o molecular) de la H^+ -ATP-sintasa promueve en células NRK la hiperpolarización de la mitocondria y el aumento significativo del flujo glucolítico. Por otro lado, no se aprecian diferencias significativas entre el efecto producido por la sobre-expresión de IF1 salvaje y del mutante puntual H49K (Fig. 29).

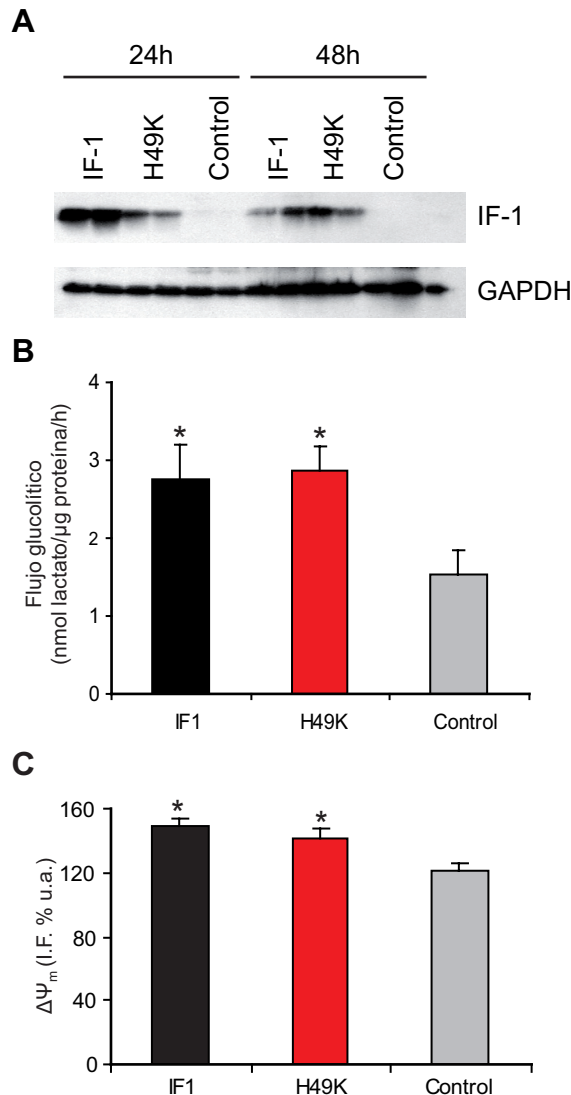


Figura 29: Efecto de la sobre-expresión de IF1 y H49K en el metabolismo energético de células NRK. **A**, Análisis de la sobre-expresión a las 24 y 48h post-transfección mediante *western blot*. Se incluye GAPDH como control de carga del análisis. **B**, Medida del flujo glucolítico en células NRK que sobre-expresan IF1 (barras negras) o el mutante puntual H49K (barras rojas). Se incluye como control el análisis de células transfectadas con el plásmido pcDNA vacío (barras grises). Los resultados muestran la media \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes. *, $P \leq 0,05$ cuando se compara el flujo glucolítico frente al de las células control mediante la prueba t de Student. **C**, Medida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en células NRK que sobre-expresan IF1 (barras negras) o su mutante puntual H49K (barras rojas). Como control se incluye la medida del $\Delta\Psi_m$ en células transfectadas con el plásmido pcDNA vacío (barras grises). El $\Delta\Psi_m$ se cuantifica mediante la sonda TMRM por citometría de flujo. En todos los casos se co-transfecta una pequeña cantidad (1/10 respecto a las citadas construcciones) de p β -GFP para seleccionar para la medida del potencial sólo las células transfectadas. Las medidas de intensidad de fluorescencia se normalizan (%) respecto a las de células tratadas con FCCP (deascoplante mitocondrial). Los resultados muestran la media \pm S.E.M. de cuatro experimentos independientes. *, $P \leq 0,05$ cuando se compara el $\Delta\Psi_m$ frente al de las células control mediante la prueba t de Student.

4.2. Modelo celular de represión traduccional de β -mRNA.

La alteración del fenotipo bioenergético, observada en la mayor parte de los tumores humanos y durante la etapa fetal del desarrollo del hígado de rata, se caracteriza por una reducción específica de la expresión relativa de β -F1-ATPasa que está asociada a la ausencia de cambios o incluso al aumento de la expresión

Resultados

de β -mRNA (ver 1.1 y 1.2.1 en Resultados; (Izquierdo y Cuezva, 1993; Izquierdo y cols., 1995; Izquierdo y Cuezva, 1997; de Heredia y cols., 2000)). Experimentos de sobre-expresión de β -F1-ATPasa en células en cultivo así como en levaduras, han demostrado la imposibilidad de conseguir un incremento significativo en los niveles de la proteína (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren la existencia de mecanismos específicos de represión de la traducción de β -mRNA en estos tipos celulares que podrían ser los mismos que controlan la expresión de β -F1-ATPasa en cáncer y durante el desarrollo (Izquierdo y Cuezva, 1997; de Heredia y cols., 2000). En este entido, hemos generado un modelo celular de represión traduccional mediante el desarrollo de una línea celular que sobre-expresa de forma estable β -mRNA. Además, con objeto de estudiar la localización subcelular y de purificar e identificar las proteínas que se unen a β -mRNA *in vivo* y que son potencialmente relevantes para el control de su traducción, a la construcción ectópica transfectada de β -mRNA se le ha introducido una etiqueta de afinidad en su extremo no traducible (Fig. 30A).



Figura 30: Generación de un modelo celular de represión traduccional de β -mRNA en células NRK. **A**, Interrupción del 3'UTR de β -mRNA dirigida a una región altamente conservada y relevante para su control traduccional. Alineamiento múltiple con Clustal W del 3'UTR de β -mRNA de distintos organismos: rata (*R. norvegicus*), humano (*H. sapiens*) y ratón (*M. musculus*). Se destaca con * cuando el mismo nucleótido tiene una posición equivalente en los tres organismos. Con una línea roja se señala la zona en la que se ha insertado la secuencia codificante para MS2h. Se muestra la secuencia de RNA, así como su estructura secundaria más estable, de MS2h en la caja roja. **B**, Cribado de clones mediante RT-PCR. Tras la transfección y selección con antibiótico se analiza la presencia del RNA de MS2 en los clones que consiguen proliferar mediante RT-PCR. En la figura se muestra el análisis de dos clones (C1 y C4) y el de un cultivo control de células no transfectadas (NT). A partir de la misma muestra se lleva a cabo la RT por duplicado, no incluyendo en una de ellas la enzima MuLV RT (RT +, RT -). La PCR se realiza con oligos específicos para la región MS2h y se realiza en paralelo un control con oligos para el 3'UTR de β -mRNA. **C**, Verificación de la inserción de β -MS2 en el genoma de C4. DNA genómico aislado del clon que resultó positivo para la expresión de MS2 en el cribado por RT-PCR (C4) se utiliza como molde para detectar la presencia del DNA que codifica para la región MS2. Como controles positivo y negativo, respectivamente, se usa asimismo el plásmido puro transfectado que contiene la construcción β -MS2 (Pls) y DNA genómico de un cultivo de células no transfectadas (NT).

4.2.1. Generación del modelo celular.

Previamente, hemos demostrado que hay dos elementos de secuencia críticos para la localización subcelular y la traducción de β -mRNA: (i) la región β 1.2, dentro del ORF (Ricart y cols., 2002), y (ii) la región 3'UTR (Di Liegro y cols., 2000; Ricart y cols., 2002). Para el etiquetado del mRNA hemos introducido tres horquillas MS2 en el extremo no traducido de β -mRNA, nueve bases por encima de la señal de poli-adenilación, de manera que la secuencia codificante de β -F1-ATPasa y estos elementos de regulación no se alteren de forma significativa y que la etiqueta esté protegida del procesamiento celular del mRNA en el extremo 3' (Fig. 30A). La inhibición traduccional de β -mRNA está asociada a la interacción de factores de forma tejido específica (Izquierdo y Cuezva, 1997). Para la elaboración del modelo hemos escogido una línea celular derivada de riñón normal de rata (NRK), ya que es en este tejido donde se observa la interacción más intensa de β -mRNA con estos factores (Izquierdo y Cuezva, 1997). Por tanto, hemos transfectado la construcción de β -mRNA de rata etiquetado con la secuencia MS2h ($r\beta$ -MS2 en los sucesivos) en células NRK y hemos seleccionado los clones que expresan este mRNA (Fig. 30B). En estos clones hemos comprobado la integración de la construcción en el genoma, de forma que podemos asegurar que la expresión de $r\beta$ -MS2 en estas células es estable (Fig. 30C). A esta línea celular la hemos denominado C4 y así nos referiremos a ella en lo sucesivo.

Los niveles estacionarios de β -mRNA en las células C4 son extremadamente elevados cuando se comparan con los de la línea celular no transfectada (NT) de la que proceden (Fig. 31A). No se observan variaciones significativas en la expresión de otros mRNAs celulares, como 18S o β -actina, lo que indica que la abundancia de β -mRNA en las células C4 es más de 100 veces superior al de las NT (Fig. 31A). De hecho, la cuantificación absoluta de β -mRNA y $r\beta$ -MS2 en las células C4 refleja que la expresión de β -mRNA endógeno no representa ni un 5% de la expresión de la construcción transfectada en estas células (Fig. 31B). Hay que puntualizar que estos resultados los hemos obtenido a partir del análisis realizado en RNA de origen citoplasmático. Este hecho indica que el $r\beta$ -MS2 se transcribe y se exporta del núcleo con normalidad en las células C4. Estas células no presentan, sin embargo, variaciones significativas en los niveles de β -F1-ATPasa y, en todo caso, se observa una ligera reducción respecto a las células NT (Fig. 31C). Globalmente, los resultados sugieren la existencia de mecanismos de represión traduccional de β -mRNA ectópico que posiblemente reflejen el fenotipo observado en algunos tumores humanos.

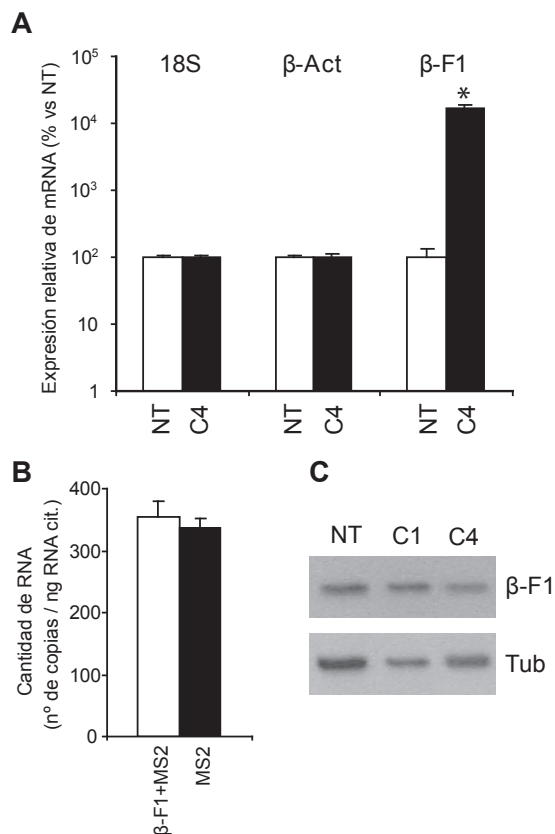


Figura 31: Expresión de β -F1-ATPasa en el modelo celular C4. **A**, Cuantificación de la expresión relativa de β -mRNA en las células C4 (barras negras) por RT-qPCR, calibrándola respecto a la de las células no transfectadas (NT, barras blancas). Se han cuantificado 18S y β -actina como genes de referencia. El histograma muestra la media \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes. *, $P \leq 0,05$ cuando se comparan los valores de expresión en las células C4 con los que se obtienen en las células NT mediante la prueba t de Student. **B**, Las células C4 expresan cantidades despreciables de β -mRNA endógeno en comparación con las del transgén. Cuantificación absoluta del número de copias de β -mRNA total (β -mRNA endógeno + r β -MS2, barra blanca) y de r β -MS2 (barra negra) en células C4. Se utiliza como patrón una curva de diluciones seriadas de un amplicón de r β -MS2 puro. Los resultados son la media \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes. **C**, La expresión de la proteína β -F1-ATPasa en las células C4 no difiere significativamente de la de las células no transfectadas. Extractos proteicos de células C4, de un clon que no

expresa r β -MS2 (C1) y del cultivo control de células no transfectadas (NT) se procesan por *western blot* utilizando anticuerpos específicos contra β -F1-ATPasa y tubulina (Tub), para comparar los niveles estacionarios de la proteína en los 3 tipos celulares.

4.2.2. Inhibición específica de traducción de β -mRNA en las células C4.

Con objeto de confirmar esta hipótesis, hemos analizado la velocidad inicial de síntesis *in vivo* de β -F1-ATPasa en las células C4 (Fig. 32A). Sorprendentemente, en estos experimentos no hemos visto diferencias significativas en la síntesis relativa de β -F1-ATPasa en las células C4 cuando se compara con la que se da en las células NT (Fig. 32B), lo que excluye un efecto dominante negativo de r β -MS2. Otras proteínas como Hsp60 sí presentan una leve reducción en su tasa de síntesis (Fig. 32B), aunque la síntesis global de proteínas, estimada por la incorporación de ³⁵S-Met en la proteína celular, es igual en ambos tipos celulares (Fig. 32C). Por lo tanto, sin descartar la posibilidad de que la degradación de β -F1-ATPasa en las células C4 pueda estar ligeramente aumentada, podemos afirmar que existe una fuerte represión traduccional sobre β -mRNA en este modelo celular. De hecho, a partir de estos resultados (Figs. 31 y 32) hemos determinado que en las células C4 la eficiencia traduccional relativa de β -mRNA (endógeno + r β -MS2), expresada como la síntesis relativa de β -F1-ATPasa respecto a la de Hsp60 y corregida por la cantidad de β -mRNA, es más de 100 veces inferior a la que presenta en las células NT (Fig. 32D).

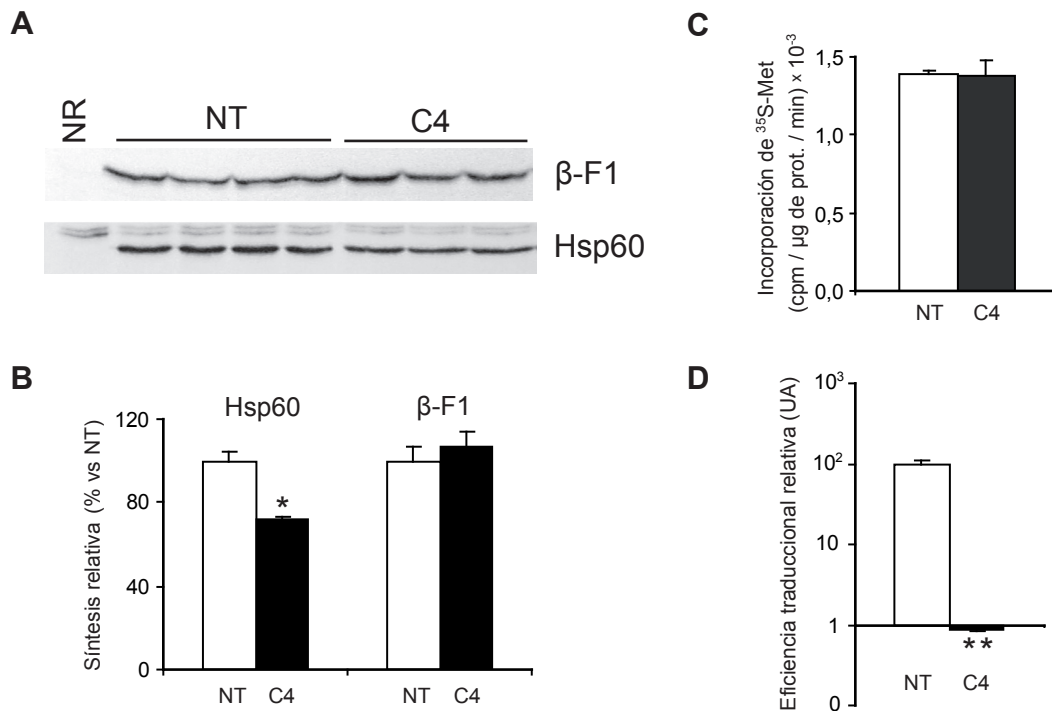


Figura 32: Inhibición específica de la traducción de r β -MS2 en células C4. **A**, Análisis de la síntesis *in vivo* a corto plazo de β -F1-ATPasa y Hsp60. Se realiza un marcaje metabólico (^{35}S -met) de las proteínas de células C4 y células control no transfectadas (NT). A continuación, se inmunoprecipitan β -F1-ATPasa y Hsp60, y se visualiza la proteína sintetizada durante el marcaje. En el primer carril se muestran los inmunoprecipitados con anticuerpos no relevantes (NR): suero pre-inmune (panel superior) e IgGs de ratón (panel inferior). **B**, La cuantificación de la síntesis relativa de β -F1 y Hsp60 se realiza por densitometría de las bandas radiactivas y se normaliza con el valor medio de las densitometrías de cada proteína correspondientes a las células NT del mismo gel (% vs NT). Los resultados son la media \pm S.E.M. de 4 experimentos independientes. *, $P \leq 0,05$ cuando se comparan los valores de síntesis en las células C4 frente a los que se obtienen en células transfectadas con β -Gal mediante la prueba de la *t* de Student. **C**, Las células C4 presentan la misma tasa de síntesis global de proteínas celulares. La velocidad de síntesis global de proteínas celulares se valora mediante la cuantificación de la incorporación de ^{35}S -met durante el tiempo del marcaje a la proteína celular precipitable por ácido tri-Cl-acético. En el histograma se presentan estos datos normalizados respecto a la cantidad de proteína total de las células. Los resultados son la media \pm S.E.M. de cuatro experimentos independientes. **D**, La eficiencia traduccional relativa se ha calculado como el cociente de la expresión relativa de β -F1-ATPasa normalizada respecto a la de Hsp60 (**B**) entre los niveles estacionarios de β -mRNA (referenciados a β -Actina y 18S, Fig. 31A) en las células C4 y en las células no transfectadas (NT). **, $P \leq 0,01$ cuando se compara los valores de eficiencia traduccional relativa de β -mRNA en las células C4 con los de las células NT mediante la prueba *t* de Student.

4.2.3. r β -MS2 se acumula en gránulos citoplasmáticos de gran tamaño.

El mRNA que codifica β -F1-ATPasa se encuentra mayoritariamente agrupado en el seno de estructuras subcelulares de gran tamaño localizadas en el citoplasma y frecuentemente asociadas a la mitocondria (Egea y cols., 1997; Ricart y cols., 1997). Nos hemos propuesto el estudio de la localización subcelular de r β -MS2 en las células C4. Para este objetivo hemos abordado una técnica de visualización *in vivo* del RNA r β -MS2 en las células C4 (Fig. 33A). Ésta consiste en la expresión en

Resultados

estas células de una proteína de fusión formada por la proteína de la cápsida del virus MS2 (CP), que presenta una alta afinidad por las horquillas MS2, y la GFP con una señal de localización nuclear (Rook y cols., 2000). De esta forma, CP-GFP en las células NT se queda retenida exclusivamente en el núcleo (Fig. 33B), mientras que en las células C4 una parte está dirigida a los sitios donde se acumula r β -MS2 (Fig. 33C). De hecho, en las células C4 se observan grandes acumulaciones citoplasmáticas de GFP en forma de grumos (Fig. 33C) que no se observan en las células NT (Fig. 33B). La aparición de estos grumos en puntos lejanos al núcleo descarta la posibilidad de un vertido de GFP debido a sobre-carga del núcleo y/o toxicidad. De hecho, en aquellas células en las que se ve que ha existido un escape de material del núcleo se observa una alteración de la morfología nuclear y, además, el patrón de distribución citoplásmico de GFP es homogéneo y no se corresponde con el descrito para las células C4 (Fig. 33C). Estos resultados se reproducen en experimentos de co-transfección transitoria de las construcciones de r β -MS2 y CP-GFP en células NRK (resultados no mostrados). Estos datos sugieren que r β -MS2 se encuentra localizado en sitios concretos en el citoplasma formando estructuras de gran tamaño.

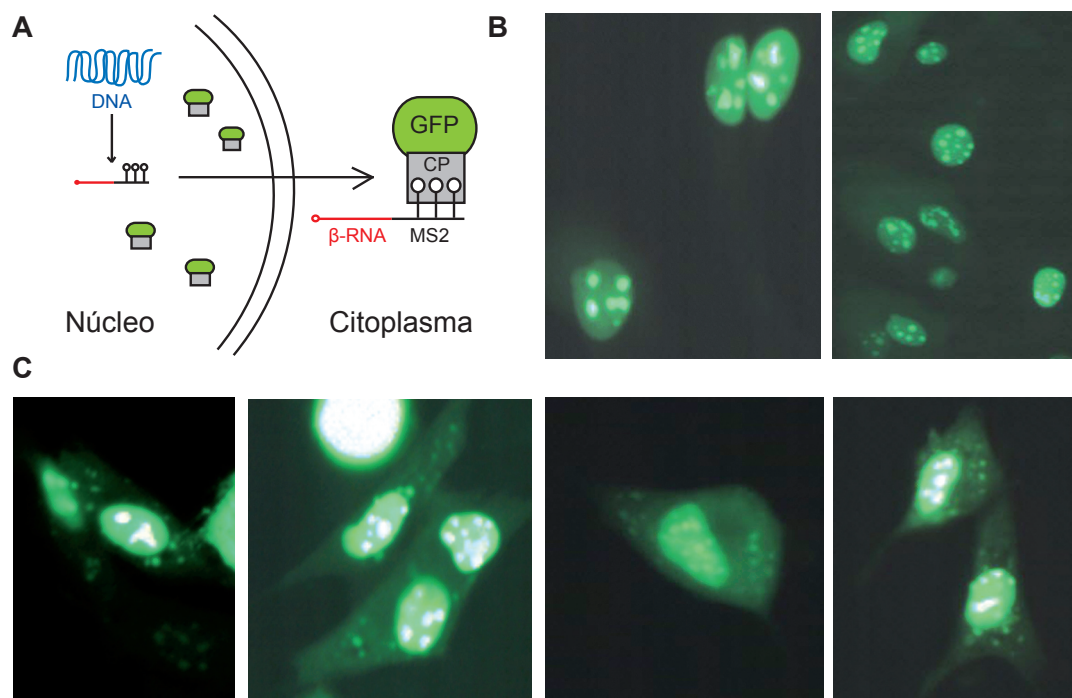


Figura 33: Localización subcelular de r β -MS2 *in vivo* en células C4. **A** Esquema de la técnica de visualización *in vivo* de RNA. En el núcleo de las células C4 se está produciendo una activa transcripción de r β -MS2 que posteriormente se exporta al citoplasma donde se acumula. Células C4 son transfectadas con una construcción que codifica una proteína de fusión formada por GFP y la proteína de la cápsida de MS2 (CP) junto con una señal de localización nuclear. r β -MS2 puede asociarse con GFP-CP tanto en el núcleo como en el citoplasma y dirigirla a los sitios donde se acumula este RNA. **B** y **C** Fotografías con microscopio de fluorescencia de cultivos control de células NRK (**B**, hasta ahora denominadas NT) y de células C4 (**C**) transfectadas ambas con la GFP-CP. Las fotografías están realizadas a 400X.

A continuación nos hemos preguntado por la distribución subcelular relativa de β -mRNA y r β -MS2 en gradientes de densidad de sacarosa (Fig. 34A y B). En estos gradientes se identifican ribosomas con proporciones equimoleculares de los rRNAs 18S y 28S en las fracciones 1-7 (Fig. 34C y D), lo que sugiere que en estas fracciones donde se puede estar llevando a cabo traducción activa de mRNAs. Sorprendentemente, observamos que β -mRNA y r β -MS2 se localizan mayoritariamente en regiones de densidad intermedia (fracciones 5 y 6, ver Fig. 34 E) y que su distribución es básicamente igual en las células C4 y en las NT (Fig. 34E). La cuantificación del β -mRNA de cada fracción fue calibrada respecto a la del extracto celular antes del fraccionamiento de forma que es posible establecer una comparación de la distribución en ambos tipos celulares (Fig. 34E). Además, hay que destacar que esta distribución de β -mRNA es igual a la que presenta el mRNA de β -actina (Fig. 34F). Estos resultados indican que la localización subcelular de β -mRNA y r β -MS2 es la misma, co-fraccionando con polisomas aunque, paradójicamente, en el caso de r β -MS2 su traducción está reprimida. Estos resultados sugieren que la localización y la competencia traduccional de β -mRNA no están necesariamente ligadas.

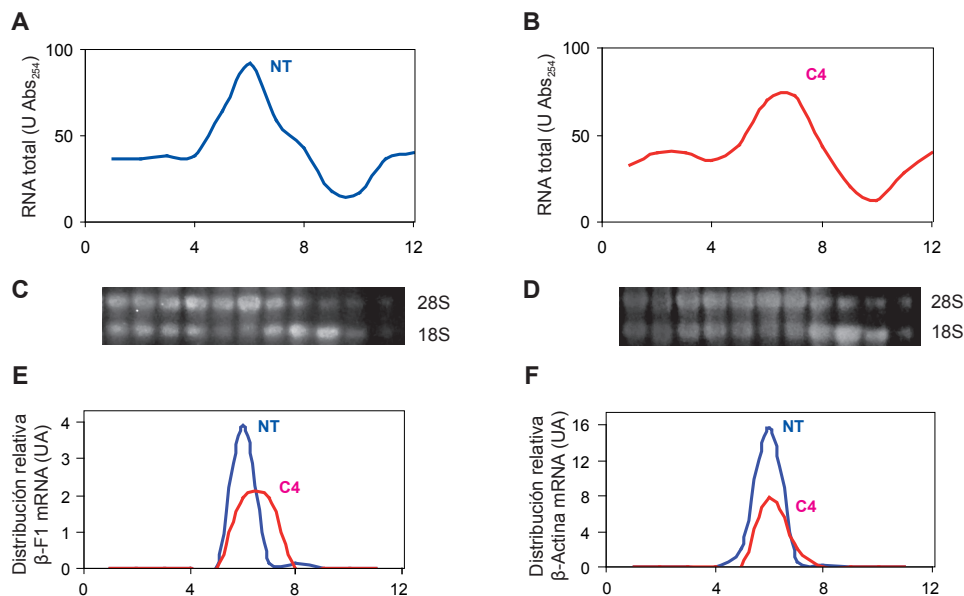


Figura 34: Localización subcelular de β -mRNA en células C4 en gradientes de sacarosa 15-40%. Se ha realizado el fraccionamiento subcelular de extractos de células C4 y células control no transfectadas (NT) y se ha estudiado la distribución de β -mRNA y el mRNA que codifica β -Actina por RT-qPCR. **A y B**, Perfil de absorbancia a 254 nm del RNA purificado de las fracciones de los gradientes de células no transfectadas (**A**) y células C4 (**B**). **C y D**, Contenido en rRNAs 28S y 18S en las fracciones del gradiente de células NT (**C**) y de células C4 (**D**). **E y F**, Patrón de distribución de β -mRNA (**E**) y del mRNA de β -Actina (**F**) en células NT (líneas azules) y C4 (líneas rojas) fraccionados en gradientes de sacarosa. En el eje de ordenadas se representa la cuantificación relativa de los niveles de RNA en las distintas fracciones calibradas respecto a la cantidad total de ese RNA en el extracto sin fraccionar.

4.2.4. r β -MS2 interacciona *in vivo* con proteínas del citoesqueleto.

Dado que r β -MS2 tiene la misma distribución que β -mRNA, puede ser utilizado como cebo para la purificación de proteínas relevantes para el control de su localización y/o traducción. Por lo tanto, el siguiente objetivo ha sido la purificación e identificación de las proteínas que interaccionan *in vivo* con r β -MS2. En contraste con la técnica descrita en la sección 3 de Resultados (ver Fig. 20), el RNA híbrido se transcribe y se procesa por la maquinaria celular y los complejos RNA-proteína

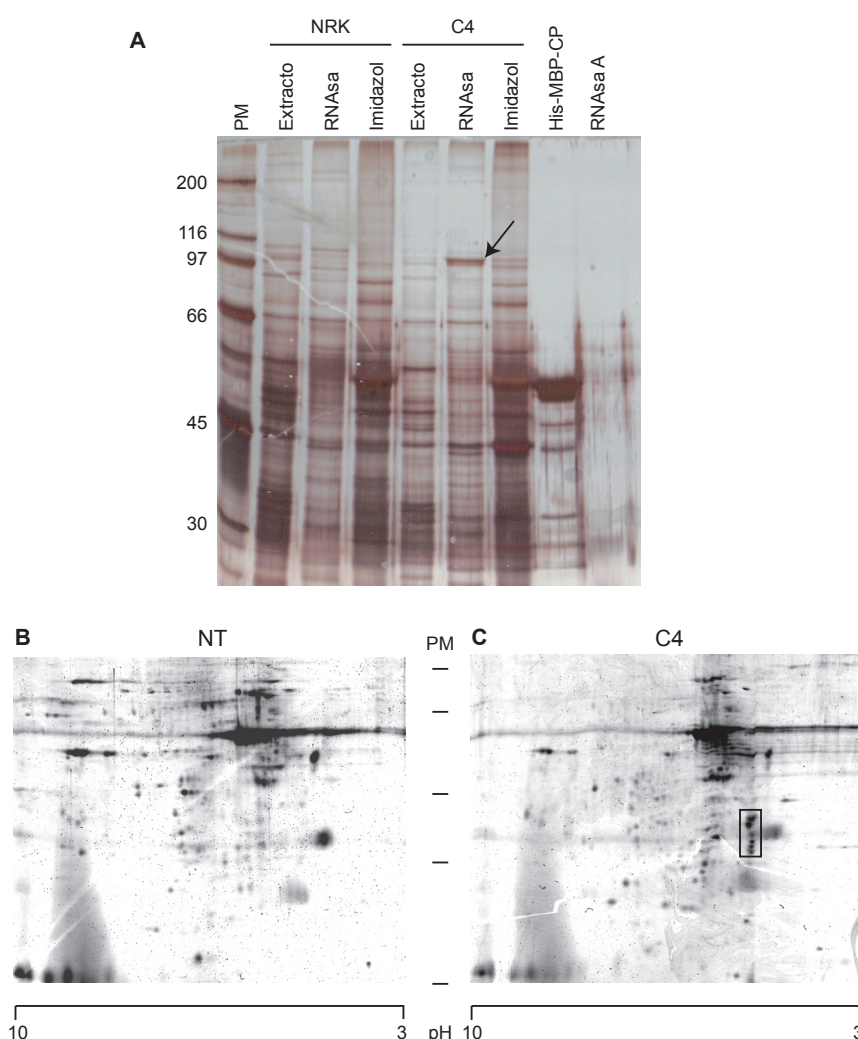


Figura 35: Purificación de las proteínas que interaccionan con r β -MS2 *in vivo*. Extractos totales de células C4 y cultivos control de células no transfectadas (NT) se incuban con His-MBP-CP inmovilizada a resina de Ni²⁺ y se procede con el método para la purificación de proteínas de unión a RNA descrito detalladamente en la sección 3.1 de Resultados (Fig. 20). Las eluciones (RNAsa e Imidazol) de las purificaciones se fraccionan por SDS-PAGE y se tiñen con plata (**A**). La flecha indica la banda identificada como α -actinina (Tabla 5). Alternativamente, las eluciones de las purificaciones a partir de NT (**B**) y C4 (**C**) se fraccionan por electroforesis bidimensional. El cuadro indica las bandas identificadas como vimentina (Tabla 5). pH hace referencia al rango de pH que se ha utilizado para la separación de las proteínas por su punto isoeléctrico. PM hace referencia a la mezcla de proteínas de peso molecular conocido en la segunda dimensión: 97, 66, 45, 30 y 20 kDa.

se forman en el interior de las células C4. Así, para la precipitación específica de los complejos, sobre un extracto de células C4 se añade únicamente His-MBP-CP inmovilizada en la resina de afinidad de Ni^{2+} . Como control en estos experimentos se utilizan las células no transfectadas. La resina se lava y se eluyen secuencialmente las RNABPs mediante la digestión de $\text{r}\beta\text{-MS2}$ con RNasa y la desorción de His-MBP-CP con imidazol (Fig. 35A). Para aumentar la especificidad de estos ensayos hemos utilizado una cantidad mayor de material biológico de partida de células NT que de C4, de forma que los posibles falsos positivos se pongan más claramente de manifiesto en las eluciones de los controles NT (Fig. 35A y B). Así, hemos identificado α -actinina como la proteína más claramente enriquecida en las purificaciones de las células C4 (Fig. 35A). Sin embargo, además de ésta se eluyen numerosas proteínas, lo que puede dificultar la comparación de los patrones de elución (Fig. 35A). En este sentido, para distinguir de forma más clara las bandas que específicamente han sido purificadas unidas al $\text{r}\beta\text{-MS2}$, hemos fraccionado las proteínas eluidas mediante electroforesis bidimensional (Fig. 35B y C). La mayor resolución de esta técnica nos ha permitido identificar con claridad una serie de bandas con un $\text{pI} \sim 5,1$ y un rango de peso molecular aproximado 32-45 kDa, que se corresponden con la vimentina (Fig. 35C). Este resultado sugiere que estas bandas pueden ser fragmentos procesados o de degradación de la vimentina o que ésta puede presentar una movilidad electroforética aberrante. En la Tabla 5, se resumen los resultados y las características más destacadas de las secuenciaciones que se han llevado a cabo con algunas de las bandas. Hay que destacar que todas ellas son proteínas del citoesqueleto (Tabla 5). Estos resultados sugieren que $\text{r}\beta\text{-MS2}$ está asociado *in vivo* a redes de microfilamentos y de filamentos intermedios los cuales, pueden estar participando en la localización y represión traduccional de $\text{r}\beta\text{-MS2}$ en células C4.

Nº de acceso	Nombre de la proteína	PM	Péptidos	% cob. secuencia	Mascot Score
gi 119577215	Actinin 4 subunit alpha	104	17	23	244
gi 14389299	Vimentin	54	18	40	205

Tabla 5: Resumen de las proteínas celulares identificadas que se unen específicamente a $\text{r}\beta\text{-MS2}$. Se muestra la referencia (nº de acceso) y nombre de la proteína según la denominación de la base de datos Protein del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), así como su peso molecular teórico (PM) predicho a partir de su secuencia de aminoácidos. *Péptidos* es el número de péptidos cuya masa coincide con la de los péptidos de la colección asignada a esa proteína a partir de su digestión teórica. *Cobertura de secuencia* es el porcentaje de la secuencia de la proteína que queda cubierta por los péptidos identificados. El *Mascot score* se calcula como $S = -10 \cdot \log(P)$, siendo P la probabilidad de que la coincidencia entre las masas de los péptidos se produzca por azar. La significatividad de estos resultados depende del tamaño de la base de datos y el motor de búsqueda Mascot establece un punto de corte en $P = 0,05$, que equivale aproximadamente a un Mascot score = 70 (Ver Material suplementario A1 en anexo I).

DISCUSIÓN

1. La alteración del fenotipo bioenergético es una característica de la célula tumoral

La mayor parte de los tumores humanos presenta una tasa elevada de consumo de glucosa cuando se compara con la del tejido no transformado del que proceden. A principios del siglo pasado, el científico alemán Otto Warburg propuso que esta característica era el resultado del “daño irreversible de la respiración” (alteración de la función mitocondrial), constituyendo un rasgo característico de la célula cancerosa (Warburg, 1956). En este trabajo, hemos puesto de manifiesto la alteración del fenotipo bioenergético de la mitocondria en carcinomas de pulmón y de piel mediante la valoración de los niveles relativos de expresión de una proteína que es el cuello de botella de la función bioenergética de la mitocondria (β -F1-ATPasa) (Boyer, 1997). Estos resultados concuerdan con lo descrito recientemente en carcinomas de colon, riñón (Cuezva y cols., 2002), mama, esófago y estómago (Isidoro y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005). Dado que este fenotipo puede ser consecuencia de la alteración en el complemento mitocondrial de la célula y/o de la diferenciación funcional del orgánulo, hemos determinado en paralelo la expresión de una proteína estructural de la mitocondria (Hsp60) así como de proteínas celulares (GAPDH, PK) con el objetivo de poder inferir el programa de biogénesis mitocondrial que puede estar alterado en estos tipos de cáncer (Cuezva y cols., 1997). En BCC se observa una disminución significativa de β -F1 en ausencia de cambios en Hsp60, mientras que en los dos tipos histológicos de carcinomas de pulmón la expresión de Hsp60 experimenta una fuerte inducción. Es decir, la respuesta mitocondrial es distinta para cada tipo celular estudiado. En BCC, aparentemente la represión de la expresión de β -F1 se ejerce en ausencia de cambios en Hsp60, lo que sugiere un mecanismo selectivo de represión de la traducción de β -mRNA en estos carcinomas, ya que la expresión de su transcrito no se ve afectada. Por el contrario, en carcinomas de pulmón la represión de β -F1, que también se ejerce aparentemente a nivel de la traducción (Fig.4), se está produciendo en una situación de activa biogénesis mitocondrial. Además, en carcinomas de pulmón la alteración del proteoma mitocondrial lleva asociada la inducción de enzimas de la vía glucolítica (GAPDH, PK), lo que parece indicar que en este tipo de tumores el déficit energético y/o de provisión de precursores biosintéticos derivado de la posible disfunción mitocondrial para la proliferación celular requiere de la potenciación de la glucolisis.

Surge de forma inmediata la cuestión de si la variación de los niveles de expresión de los marcadores de las dos vías de provisión de energía celular que hemos

descrito está asociada con una alteración real del metabolismo de la célula tumoral. En este sentido, la estimación de la captación de glucosa mediante FDG-PET en carcinomas de pulmón está directamente asociada con los niveles de expresión de GAPDH e inversamente con los de β -F1-ATPasa (Tabla 1). Es más, el índice bioenergético celular (β -F1/GAPDH) correlaciona significativamente con la utilización aeróbica de la glucosa de forma inversa (Lopez-Rios y cols., 2007). Estos hallazgos ponen de relieve la caracterización proteómica del fenotipo bioenergético como un indicador de la alteración de la actividad mitocondrial en la célula tumoral.

En consecuencia, dado que la alteración del fenotipo metabólico es un indicador de la transformación celular sugerimos su potencial utilidad para el diagnóstico y seguimiento en la clínica oncológica. De hecho, en los últimos 30 años la prueba funcional FDG-PET se está utilizando en clínica en el mundo desarrollado como un método válido para la detección de tumores primarios y metástasis, así como para valorar la respuesta al tratamiento, la recidiva tras la resección y para el pronóstico de los pacientes (Vansteenkiste y cols., 2004). Coherentemente, en este trabajo hemos demostrado que la huella bioenergética es un marcador proteómico con alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de carcinomas de pulmón (Fig. 5), como hemos demostrado previamente en adenocarcinomas de pulmón (Cuezva y cols., 2004) y de mama (Isidoro y cols., 2005). Asimismo, hemos mostrado que esta alteración está asociada con la supervivencia de los pacientes con carcinomas de pulmón (Fig. 7), de acuerdo con trabajos previos que han mostrado la utilidad del índice bioenergético en prognosis en carcinomas de colon (Cuezva y cols., 2002), mama (Isidoro y cols., 2005) y pulmón (Cuezva y cols., 2004; Lopez-Rios y cols., 2007) y con la adquisición del fenotipo invasivo por parte de melanomas (Govindarajan y cols., 2007). La gran ventaja de FDG-PET es que es una técnica no invasiva, sensible y con una reproducibilidad aceptable, aunque actualmente todavía presenta importantes limitaciones técnicas (Soret y cols., 2007). Sin embargo, su implantación en el sistema público de sanidad se ve seriamente condicionada por el grado de desarrollo del país debido a los enormes costes económicos que este sistema implica. De hecho, un informe reciente de la Sociedad Española de Medicina Nuclear revela que estos sistemas tan sólo están disponibles en 11 hospitales públicos en España (<http://www.semn.es/pet04.php>). Por lo tanto, a pesar de la importancia de la información que aporta esta técnica, su implantación a nivel global es más que dudosa. La implementación del estudio de la huella bioenergética en las biopsias tumorales aporta la información sobre el metabolismo tumoral que, junto a la de los marcadores clinico-patológicos, facilitará

el manejo clínico de pacientes oncológicos, con la ventaja añadida de que esta determinación conlleva un análisis sencillo, barato y que no exige ni instalaciones específicas ni personal especializado (Acebo y cols., 2008).

Todo indica que la adquisición del fenotipo glucolítico como respuesta a la disfunción mitocondrial es una condición necesaria en el proceso de carcinogénesis. Sin embargo, no está claro qué ventaja adaptativa obtiene la célula tumoral. Cuando las células proliferan son mayoritariamente glucolíticas (Wang y cols., 1976; Brand y Hermfisse, 1997) ya que ésta es la vía más activa durante las fases S, G2 y M del ciclo celular (las fases reductivas del ciclo metabólico) y cuando se están sintetizando los componentes moleculares de la mitocondria (Martinez-Diez y cols., 2006; Reinke y Gatfield, 2006). Se ha sugerido que el uso preferencial de esta vía podría constituir un mecanismo de protección del DNA de los radicales libres generados en la mitocondria durante su replicación (Brand y Hermfisse, 1997), manteniendo la integridad del genoma en esta etapa en la que es particularmente vulnerable al daño oxidativo (Chen y cols., 2007), que es precisamente cuando se sintetizan los componentes mitocondriales (Martinez-Diez y cols., 2006). La glucolisis es una vía de producción de energía menos eficiente que la fosforilación oxidativa y, además, produce lactato que promueve una acidificación del entorno extracelular con efectos tóxicos. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que la inducción glucolítica que se observa en células tumorales es suficiente para cubrir las necesidades energéticas de la célula (Plas y Thompson, 2005) y que la acidificación del microambiente puede ser, de hecho, una ventaja proliferativa para la célula tumoral (Gatenby y Gillies, 2004). Además, los núcleos tumorales son generalmente hipóxicos por lo que la activación de una vía de producción de energía eficiente en ausencia de oxígeno supone otra ventaja para estas células (Gatenby y Gillies, 2004). Sin embargo, la glucolisis no es sólo una vía de producción de energía sino que aporta precursores de rutas biosintéticas de muchos aminoácidos, azúcares y coenzimas, por lo que existe una retirada masiva de intermediarios de la vía (ver Fig. 11). Un ejemplo de esta actividad biosintética de las células tumorales está representado por una actividad aumentada de la vía de pentosas fosfato. Ésta da lugar a una gran cantidad de NADPH que es necesario para las rutas biosintéticas y especialmente para la síntesis de ácidos grasos (Hatzivassiliou y cols., 2005; Ramos-Montoya y cols., 2006). Además, se ha descrito en levaduras que durante la fase reductiva del ciclo metabólico se da una actividad biosintética muy elevada (fase reductiva constructiva) (Reinke y Gatfield, 2006).

Por otro lado, la ejecución del programa de muerte celular requiere una fosforilación oxidativa eficiente (Dey y Moraes, 2000; Tomiyama y cols., 2006) y, en concreto, la actividad de la H^+ -ATP-sintasa (Matsuyama y cols., 1998; Santamaria y cols., 2006), que podría actuar controlando la producción de especies reactivas de oxígeno conteniendo el daño celular que provocan (Santamaria y cols., 2006).

Hasta ahora no se ha demostrado si la alteración de la función mitocondrial es un factor necesario o, por el contrario, es un fenotipo secundario en el proceso de carcinogénesis. La alteración de la función mitocondrial es una condición generalizada de carcinomas humanos puesto que ha sido descrita en numerosos tipos de tumores y además afecta a más del 97% de los tumores en grandes cohortes de pacientes (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2004; Isidoro y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005), lo que sugiere que es en realidad un factor necesario en tumorigénesis. Cada tipo celular presenta una dependencia específica de la fosforilación oxidativa y/o la glucólisis como vía de obtención de energía metabólica, por lo que es previsible que respondan de distinta forma ante estímulos que provocan una disfunción de la mitocondria. En este sentido, la inhibición farmacológica de la H^+ -ATP sintasa con oligomicina promueve un aumento significativo del flujo glucolítico de células NRK hasta casi duplicarlo. Esto indica que la provisión de ATP recae en gran medida en la fosforilación oxidativa en estas células y que, por lo tanto, constituyen un buen sistema para emular la reprogramación metabólica que ocurre en cáncer. Con este propósito, hemos expresado IF1 en NRK con el objetivo de desarrollar en el próximo futuro un modelo animal de interferencia genética de la OXPHOS que es un buen sistema experimental para contestar la pregunta que nos hacíamos anteriormente. El inhibidor fisiológico del complejo V, IF1, está sobre-expresado en varios tipos tumorales y se ha descrito que su asociación al complejo y su actividad inhibidora están también aumentadas en estos tumores (Luciakova y Kuzela, 1984; Bravo y cols., 2004). Coherentemente, hemos observado que la sobre-expresión de IF1 promueve asimismo un incremento significativo del flujo glucolítico en las células NRK así como un aumento del potencial de membrana de la mitocondria.

Se acepta que IF1 es más activo en condiciones de hidrólisis de ATP, es decir, cuando la H^+ -ATP sintasa funciona en sentido reverso translocando H^+ al citoplasma en contra del gradiente a costa de la hidrólisis de ATP mitocondrial (Green y Grover, 2000). Este funcionamiento en reverso ocurre en circunstancias excepcionales y es extremadamente tóxico para las células porque puede propiciar

la generación de radicales libres (Santamaria y cols., 2006). En condiciones de isquemia, el cardiomiocito se vuelve glucolítico y se activa la función ATPasa que se inhibe parcialmente por IF1 de forma dependiente del pH, retrasando así la depleción de ATP celular (Rouslin y Broge, 1993). Este efecto protector de IF1 podría manifestarse en respuesta a estrés metabólico, hipóxico o de xenobióticos en células tumorales. La actividad de IF1 depende del pH (Cabezón y cols., 2000). Nosotros hemos generado un mutante puntual (H49K) que conserva intacta su actividad inhibidora y que en teoría se une a la ATPasa independientemente del pH de la matriz (Cabezón y cols., 2000). Sin embargo, nuestros resultados indican que IF1 y su forma mutante pueden estar inhibiendo la función ATP sintasa de la mitocondria. En resumen, esta proteína puede jugar un papel fundamental promoviendo el cambio del fenotipo bioenergético así como en la supervivencia celular en situaciones de estrés. Estos resultados apoyan la validez de este modelo para estudios posteriores de la implicación de la abolición parcial de la función mitocondrial en el desarrollo de patologías humanas y en la progresión tumoral, lo que nos ha estimulado para la realización de un modelo animal de sobre-expresión de IF1-H49K condicionada y específica de tejido.

2. Bases moleculares de la huella bioenergética: regulación post-transcripcional de la expresión de β -mRNA

2.1. Desarrollo de una metodología de purificación de β -mRNABPs

El estudio de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de las proteínas cuyos niveles están alterados en la célula cancerosa nos permite identificar nuevos marcadores que potencialmente pueden tener utilidad para el diagnóstico y pronóstico de pacientes en clínica. Además de aportar un conocimiento más detallado de los procesos celulares implicados, nos proporciona pistas para intentar evitar la alteración del fenotipo bioenergético de la célula tumoral con el fin de desarrollar aplicaciones terapéuticas de la huella metabólica del cáncer (Pelicano y cols., 2006; Santamaria y cols., 2006). Los resultados de este trabajo indican que la expresión relativa de β -F1-ATPasa está reprimida en BCC y en carcinomas de pulmón aun cuando los niveles del mensajero no varían o están aumentados, sugiriendo la represión traduccional del mRNA en estas situaciones. De acuerdo con la afirmación de Otto Warburg “la ontogenia es una recapitulación de la filogenia”, la reprogramación metabólica está en el origen de la célula tumoral (Warburg, 1956). En efecto, el metabolismo energético de las células proliferativas des-diferenciadas de hepatocarcinomas reflejan el fenotipo del hepatocito fetal (de Heredia y cols., 2000 ; Cuezva y cols., 1997). En este sentido, durante la

etapa fetal del desarrollo del hígado de rata las mitocondrias no son competentes para la producción de energía, debido fundamentalmente a que presentan unos niveles muy reducidos de todos los componentes OXPHOS, incluido β -F1-ATPasa (Valcarce y cols., 1988) mientras que, paradójicamente, el mensajero es muy abundante y más estable (Izquierdo y cols., 1995). Hemos descrito que el control de la traducción de β -mRNA en esta etapa del desarrollo (Izquierdo y Cuezva, 1997) así como en hepatocarcinomas (de Heredia y cols., 2000) y durante el ciclo celular (Martinez-Diez y cols., 2006) se ejerce por la existencia de un conjunto de proteínas que se unen a la región 3'UTR del mRNA (Izquierdo y Cuezva, 1997; 2005; Cuezva y cols., 2007) y a una región del ORF (Ricart y cols., 2002) y que inhiben su traducción presumiblemente impidiendo el acceso de la maquinaria traduccional a esta región intensificadora de la traducción (Izquierdo y Cuezva, 1997; de Heredia y cols., 2000; Izquierdo y Cuezva, 2000; Cuezva y cols., 2007). Por lo tanto, para dilucidar el mecanismo molecular responsable de la represión específica de la expresión de β -F1-ATPasa en cáncer es crucial la identificación de los factores que se unen a su mRNA, ya que son potencialmente responsables de su destino metabólico.

Con este objetivo, hemos desarrollado una metodología experimental mediante la que hemos conseguido purificar e identificar 12 proteínas que presentan afinidad a β -mRNA (Tablas 4 y 5; Figs. 8, 9, 21 y 35). La información disponible en la literatura referente al desarrollo de técnicas cromatográficas o genéticas para la identificación de RNABPs es muy escasa (Jaeger y cols., 2004) y su utilidad generalmente ha quedado restringida para confirmar la interacción entre una proteína candidata y un RNA diana de interés. Además, este tipo de metodologías presentan un rendimiento pobre y una reducida especificidad y su implementación en diferentes sistemas experimentales requiere una cuidadosa labor de puesta a punto que, desgraciadamente y en nuestro laboratorio, ha resultado infructuosa durante muchos años.

Hemos demostrado que la aplicación directa de la técnica de purificación por afinidad de RNABPs, inicialmente descrita por Bardwell y Wickens (Bardwell y Wickens, 1990) (MS2h/MS2-CP) y desarrollada más tarde por el laboratorio de R. Reed (Zhou y cols., 2002), no es útil para la purificación a gran escala de las proteínas que se unen a β -mRNA principalmente por dos razones. La primera, es que la interacción de la maltosa con la MBP induce un cambio conformacional en la proteína que la inhabilita para unirse de nuevo a la resina de amilosa. De hecho,

se ha resuelto la estructura de la MBP libre y unida al ligando, demostrándose que la maltosa induce una transición conformacional de la MBP que pasa de un *estado abierto* a un *estado cerrado* estable (Spurlino y cols., 1991; Millet y cols., 2003). Este cambio estructural implica la rotación de un dominio respecto a otro promoviendo el cierre del centro activo y atrapando al ligando entre ellos (Millet y cols., 2003). Por lo tanto, la purificación mediante cromatografía de afinidad con resina de amilosa de la MBP-CP recombinante producida en un sistema bacteriano es incompatible con el uso posterior de esta proteína para llevar a cabo la purificación de RNABPs con el mismo sistema. Para evitar este problema, nosotros hemos generado una construcción de MBP-CP con una etiqueta de afinidad de 5 histidinas en su extremo N-t (His-MBP-CP) que permite su purificación a homogeneidad mediante cromatografía en tándem a partir del sistema de expresión bacteriano (Pryor y Leiting, 1997; Terpe, 2003) y que mantiene intacta su afinidad tanto por el MS2 RNA como por las resinas de amilosa y Ni^{2+} . Además, el uso de la resina de afinidad de Ni^{2+} para la purificación de His-MBP-CP evita la adsorción inespecífica de ácidos nucleicos a la resina de amilosa (Jurica y cols., 2002) y nos permite una mayor astringencia en las condiciones de unión y lavado de la resina, dado que la unión de la proteína a través de enlaces de coordinación es más estable que la unión de la MBP a la amilosa por puentes de hidrógeno (Spurlino y cols., 1991).

La segunda razón es que, en las condiciones del ensayo de purificación de las RNABPs, MBP-CP interacciona *per se* (independientemente de la presencia del hRNA) con un elevado número de proteínas celulares que finalmente copurifican con las β -mRNABPs específicas (Fig. 19). Un problema añadido es que para escalar la purificación de β -mRNABPs es necesario el uso de un exceso de material biológico de partida y de MBP-CP. La elución con maltosa desorbe una gran cantidad de la proteína de fusión que al resolverla por SDS-PAGE imposibilita la identificación de proteínas por su huella peptídica en el rango de 45-60 kDa. Hay que destacar que las proteínas más relevantes para el control de la traducción de β -mRNA durante el desarrollo embrionario (Ricart y cols., 2002; Izquierdo y Cuezva, 2005) y en oncogénesis (de Heredia y cols., 2000) muestran un peso molecular en torno a 50 kDa. En esta tesis, hemos resuelto estos inconvenientes mediante la elución específica de las proteínas que están unidas al hRNA mediante su digestión con RNasa A, minimizando de esta forma la cantidad de MBP-CP desorbida y, por tanto, de los contaminantes inespecíficos que se asocian a MBP-CP. Por último, hemos acortado el tiempo total de exposición del hRNA a las RNAsas celulares del material biológico de partida gracias a la optimización de la cinética y estequiometría de la reacciones, reduciendo el número de incubaciones

y estabilizando el hRNA inmovilizándolo previamente a la resina. Este punto es importante puesto que la actividad de los inhibidores de RNAsas disponibles comercialmente disminuye notablemente a menos de 10°C y con un elevado volumen de reacción. En definitiva, la inclusión de la etiqueta de His en la MBP-CP y la elución con RNasa han representado dos aportaciones no sólo novedosas sino imprescindibles para el desarrollo de esta metodología en nuestro sistema experimental.

2.2. Las β -mRNABPs son proteínas multifuncionales de RNPs dinámicas

En la Tabla D1 y en el Anexo I como Material Suplementario A2, se adjunta una revisión bibliográfica sobre el papel que desempeñan las RNABPs que hemos identificado mediante esta metodología en el contexto de la regulación de la expresión génica. En su conjunto, las proteínas identificadas están implicadas en todos los pasos que controlan el destino metabólico de un mRNA desde el momento en que se transcribe hasta que se traduce. Así, se ha descrito que pueden intervenir en la regulación de la transcripción (DHX9, SFPQ, NONO, ILF3, NCL, NPM), *splicing* (SFPQ, NONO, HuR), exportación al citoplasma (DHX9, NCL, ILF3, IMP1), procesamiento (PSF, NONO, NCL, NPM), localización (NCL, NPM, PSF, NONO, G3BP, IMP1, HuR), estabilidad (IMP1, G3BP, HuR) y traducción (ILF3, G3BP, IMP1, HuR, RL8) de mRNA (Tabla D1). Puesto que cada una de estas proteínas está implicada en varios procesos distintos de regulación, es más que probable que las β -mRNABPs que hemos identificado sean proteínas multifuncionales lo cual, a día de hoy, parece más una regla que una excepción (Moore, 2005). De hecho, una misma proteína puede ser relevante en dos procesos *contiguos*, co-purificando con marcadores de ambos procesos, con lo que su deposición en la RNP puede indicar que el proceso anterior se ha llevado a cabo correctamente, evitando así la degradación del RNA (Moore, 2005). Así, el dímero SFPQ/NonO está implicado en la terminación de la transcripción y en el control del *splicing* (Kameoka y cols., 2004; Rosonina y cols., 2005), la nucleolina y nucleofosmina en todos los pasos de la biogénesis ribosomal desde la transcripción hasta el ensamblaje de la partícula y su exportación al citoplasma (Savkur y Olson, 1998; Ginisty y cols., 1999) y ZBP1 (homólogo de IMP1) se une al mRNA de β -actina en el núcleo, reprime su traducción y controla su transporte (Huttelmaier y cols., 2005).

Además, todas ellas presentan una localización subcelular variable (Tabla D1 y Material Suplementario A2 en anexo I). Por ejemplo, algunas están presentes en distintos sub-dominios nucleares (Fox y cols., 2002), otras pueden interaccionar con adaptadores o receptores de exportación mediando la translocación del núcleo al citoplasma (Borer y cols., 1989; Tang y Wong-Staal, 2000; Gwizdek y cols., 2004) y, determinadas modificaciones post-traduccionales y/o reestructuraciones de la RNP mediadas por helicasas inducen la importación al núcleo o a otros dominios citoplasmáticos (Tourriere y cols., 2001; Ostareck-Lederer y cols., 2002; Wang y cols., 2002; Huttelmaier y cols., 2005; Parrott y cols., 2005; Jankowsky y Bowers, 2006). En definitiva, esta diversidad funcional y topológica de las β -mRNABPs se lleva a cabo en el seno de la RNP. De hecho, actualmente la concepción del mRNA desnudo que transita por distintas estaciones de procesamiento ha quedado relegada a los libros de texto (Moore, 2005; Keene, 2007).

La implementación de técnicas proteómicas y transcriptómicas acopladas a la purificación bioquímica de estructuras subcelulares y/o proteínas ha permitido la determinación de la composición molecular de diversas RNPs. En este sentido, en la Tabla D2 se destaca la aparición de las proteínas que hemos identificado en el proteoma de distintas RNPs relevantes que han sido descritas. Hemos observado que las proteínas que hemos identificado están presentes en la mayor parte de las RNPs estudiadas hasta la fecha (Tabla D2). Hay que destacar que hemos considerado RNPs distintas en cuanto a la función que se les ha atribuido, la localización subcelular e incluso la especificidad de tipo celular. Para este estudio comparativo, hemos incluido otras RNABPs (TIA1, TIAR, PTB) que se han relacionado recientemente con el control de la traducción del β -mRNA aunque no las hemos identificado con nuestra aproximación bioquímica (Izquierdo, 2006; Reyes y Izquierdo, 2007).

Otro tipo de estudios más funcionales o celulares han identificado a alguna de estas proteínas como parte integrante de otras RNPs. Por ejemplo, en neuronas en desarrollo se ha descrito la presencia de G3BP, IMP1 y HuD en una RNP que controla el transporte y la traducción específica del mRNA de tau en los conos de crecimiento (Atlas y cols., 2007). Por otro lado, algunas de estas proteínas se han identificado en RNPs implicadas en la replicación, exportación y traducción de RNAs virales (Ver Material Suplementario A2 en anexo I; Tabla D1). Por tanto, durante la infección viral no sólo se produce el secuestro de la maquinaria de traducción de la célula hospedadora. Además, las actividades de otras RNABPs implicadas en

Nombre	Nº de acceso	Sinónimos	Localización subcelular	Dominios	Actividad, procesos	Infección viral	Cáncer
<i>DHX9</i>	Q08211	DEAH box 9 RHA NDH II,	N: Np, No; C	dsRBD (2) Helicasa RGG	DNA/RNA helicasas 3'-5' RNPasa; T, Ex	Ex RNA (Retrovirus) T y U Gag (HIV)	↑ pulmón (qPCR) ↑ T p16 y MDR
<i>SFPQ y NoNO</i>	P23246; Q15233	- PSF p52/p100 hPOMp100 - p54 ^{nrb} p52/p100	N: No, NMB, Np, Pspck	RGG P/Q RRM (2) +/- HPQ RRM (2) HTH +/-	T, S, 3' P, Ex	U a elementos INS (HIV) U genoma (HDV)	TL TFE3-SFPQ/TFE3-NoNO RCC Inh Eritroleucemia de Friend
<i>Nucleolina</i>	P19338	NCL C23	N: No, Np; C, PMb	Ac RRM (4) RGG	Biogénesis ribosomal Chaperona de histonas; T, P, Ex, ensamblaje	U IRES ↑ T y Trad. (Poliovirus) U NS5B (HCV) Diana de proteasa 3C (Rhinovirus)	Angiogénesis tumoral Apoptosis/supervivencia céls. Leucemia
<i>Nucleofosmina</i>	P06748	NPM B23 Numatrin NO38	N: No, Np; C	Ac (3)	Biogénesis ribosomal Chaperona de histonas; T, P, Ex,	Ensamblaje cromatina viral (Adenovirus) Repl. (Parvovirus) Efectos pleiotrópicos en T (HCV) U y loc. Tat Rev (HIV)	↑ colon, cerebro y leucemia (microarray), estómago, ovario TL leucemias Del leucemias, NSCLC
<i>ILF3</i>	Q12906	NF-AT-90 DRBP76 TCP80 NFAR MPP4	N: No, Np; C	DZF dsRBM (2) RGG	T, Ex, Trad	Ex RNA (Adenovirus) Repl. (HCV) ↓ Trad IRES (Rhinov.)	↑ cerebro (microarray) Est y Trad VEGF céls de mama

G3BP	Q13283	GAP SH3 -bind prot. 1 HDH-VIII	N, C, PMb	NTF2 Ac RRM RGG	Helicasa RNAasa; Est, L, Trad	Repl. (HCV) Factoías virales (Pox) Diana de proteasa 3C (Poliovirus)	↑ pulmón, cerebro, leucemias (microarray) mama, colon, cabeza/cuello (NB y WB) Potencial metastásico céls. pulmón y próstata HRG → ↑ T y fosf.n
IMP1	Q9NZI8	IGF2 mRNA- BP 1 CRD-BP VICKZ1 ZBP1	N, C	RRM (2) RGG KH (4)	Ex, Est, L, Trad		Expresión oncofetal ↑ hígado (IHC), colon (RT- PCR, WB), pulmón (IHC), ovario (IHC); Superv. Potencial metastático Transgénico ↑ tumor
HuR	Q15717	ELAV-like protein 1	N, C	RRM (3)	Est, L, Trad		↑ muchos tumores ↑ en C y superv. mama, ovario, estómago ↑ genes ciclo celular, angiogenesis, invasión

Tabla D1: Resumen de las características más relevantes de las β-mRNABPs identificadas. Esta tabla resume la información que se encuentra en el Material Suplementario 2 del Anexo I donde se incluyen asimismo las referencias a los trabajos originales. En la tabla se indica el **nombre** y **número** de referencia en la base de datos swissprot (<http://beta.uniprot.org/>) así como otros nombres que hay en la literatura referidos a la misma proteína (sinónimos). **Localización subcelular:** N, núcleo; Np, nucleoplasma; No, nucleolo; NMb, membrana nuclear; Pspck, paraspeckle; C, citoplasma; PMb, membrana plasmática. **Dominios:** P/Q, rico en prolina y glutamina; +/-, rico en residuos básicos y ácidos; Ac, rico en residuos ácidos; se indica entre paréntesis el número de veces que se presenta el dominio en la proteína. **Actividad, procesos:** T, transcripción; S, splicing; Ex, exportación; 3' P,

	Virus RNP		Argonaute		Splicing	RNABPs		Neuronal granules		
	HCV ¹	FluV ²	AGO1 ³	AGO2 ³	SPLICEOS. ⁴	IMP1 ⁵	ACTN4 ⁶	NCL ⁷	STAUFEN ⁸	FMRP ⁹ RNA ¹⁰
DHX9	+		+	+	+	+		+	+	+
ILF3		+	+	+	+	+		+		+
SFPQ					+					
NonO					+					
PTB	+				+				+	
TIA1					+					
TIAR										
HuR			+		+				+	HuD
NPM1		+	+	+	+		+	+	+	+
NCL	+	+	+		+	+		+	+	+
G3BP							+		Ras GAP	+
IMP1	+		+	+	IMP3	+				+
RL8			+							+
VIMENTINA		+			+					+
ACTN4						*	+		ACTN2	

Tabla D2: Presencia de las β -mRNABPs identificadas en RNPs. Esta tabla muestra la identificación de alguna de la β -mRNABPs que hemos identificado en RNPs que han sido purificadas y cuyo contenido proteómico ha sido identificado. +, indica que la proteína que está indicada en la primera columna se ha identificado en la proteómica de la RNP que se indica en la primera fila. En ocasiones se han incluido los nombres de proteínas relacionadas. Los números indican la referencia al trabajo original: ¹(Lu y cols., 2004), ²(Mayer y cols., 2007), ³(Hock y cols., 2007), ⁴(Chen y cols., 2007), ⁵(Jonson y cols., 2007), ⁶(Hara y cols., 2007), ⁷(Yanagida y cols., 2001), ⁸(Villace y cols., 2004), ⁹(Khandjian y cols., 2004), ¹⁰(Elvira y cols., 2006)

procesos de regulación de la expresión génica anteriores a la traducción pueden alterarse durante la infección viral. De hecho, el nucleolo representa una de estas dianas de secuestro viral (Hiscox, 2007). Incluso, recientemente, Jack Keene ha relacionado la hipótesis del exosoma troyano (transferencia célula-célula de retrovirus mediante la participación del exosoma) con la transferencia horizontal de RNPs entre células (Keene, 2007). Según esta hipótesis, las RNPs podrían comportarse como unidades autónomas de regulación puesto que incluyen mRNAs que codifican RNABPs que, a su vez, forman parte de RNPs reguladoras (Pullmann y cols., 2007). En este sentido, Keene sugiere la posibilidad de que estas *RNPs egoístas* podrían constituir el origen de los virus (Keene, 2007).

Pero quizá el ejemplo más claro de RNP compleja y dinámica son los gránulos de estrés (SGs). Los SGs son estructuras citoplasmáticas de gran tamaño donde se acumulan mRNAs cuya traducción está transitoriamente inhibida, junto con un complemento proteico característico que aglutina al complejo de pre-iniciación de la traducción (deficiente en complejo ternario) y RNABPs involucradas en diversos procesos de regulación post-transcripcional (Kedersha y cols., 2002). Parece ser que los SGs se encuentran formando un equilibrio dinámico tanto con los polisomas (Kedersha y cols., 2000) como con los llamados cuerpos de procesamiento (PBs), que son RNPs de menor tamaño donde se dirigen los mRNAs para ser degradados (Kedersha y cols., 2005). Estas RNPs tienen factores comunes y factores específicos (marcadores) y, de hecho, se ha descrito que existe un tránsito de factores y de mRNAs de unos complejos a otros en respuesta a las condiciones del medio (Kedersha y cols., 2005). Así, situaciones de estrés moderado derivadas del tratamiento con arsenito, choque térmico o tóxicos mitocondriales, promueven la fosforilación de eIF2 α y el ensamblaje de unos SGs que incluyen a G3BP, TIA1, TIAR, HuR (Kedersha y cols., 1999; Kedersha y cols., 2000). Más recientemente, se ha demostrado la presencia de IMP1 en SGs y su contribución a la estabilización selectiva de un determinado conjunto de mRNAs (Stohr y cols., 2006). Situaciones de estrés sostenido desencadenan el redireccionamiento de los RNAs a los PBs (Kedersha y cols., 2005). Varias de las proteínas que hemos identificado pueden formar parte de SGs y/o PBs. Además, los experimentos de localización *in vivo* de r β -MS2 indican que este mRNA puede acumularse formando grumos de gran tamaño (Fig. 33). Aunque este mRNA migra en fracciones de densidad intermedia en gradientes de sacarosa (Fig.34), su eficiencia traduccional es muy baja (Fig. 32). Estos resultados indican que la localización de este mRNA no favorece su traducción y sugieren la posibilidad de que la acumulación de r β -MS2 en grandes gránulos esté implicada en su inhibición traduccional, como ocurre en el caso de los mRNAs acumulados en SGs.

Queremos destacar que unas proteínas que abarcan un espectro tan extenso de funciones están construidas a partir de varias copias de unos pocos dominios (Tabla D1). Los dominios de unión a RNA (RBDs), del mismo tipo o estructuralmente distintos, se combinan generando una plataforma macromolecular de unión que define la especificidad de la afinidad por el RNA (Lunde y cols., 2007). La interacción entre un elemento de secuencia y un RBD suele ser débil. Así, la combinación de varios dominios con una topología determinada permite una mayor afinidad y especificidad y, lo que es más importante, una mayor versatilidad, ya que pequeñas modificaciones en esa topología, promovidas por modificaciones post-traduccionales y/o por cambios en alguno de los factores asociados, conducen al reacomodo estructural de la RNABP y, por tanto, a un cambio en la afinidad por una determinada secuencia (Lunde y cols., 2007). Por lo tanto existe una influencia mutua entre RNABPs que interaccionan con un mismo RNA y/o entre ellas, pudiéndose dar, según las circunstancias, una relación de competencia o sinergia (Langland y cols., 1999; Lal y cols., 2004). Además, la topología de la/s RNABPs implicada/s en una interacción RNABP-RNA en un momento determinado condiciona la distancia entre los elementos de secuencia para los que presenta afinidad cada dominio concreto. Por tanto, la secuencia diana de reconocimiento de cada RNABP puede constar de elementos muy separados dentro de un mismo RNA o incluso de elementos de distintos RNAs (Lunde y cols., 2007). En este sentido, queremos destacar que β -mRNA contiene dos sitios distales de unión a RNABPs (Ricart y cols., 2002) y que la purificación de las proteínas en este trabajo se ha llevado a cabo usando el mRNA completo de β -F1-ATPasa.

Este hecho tiene varias consecuencias. La primera es que un mismo mRNA puede estar regulado por varias RNABPs que, a su vez, tienen dianas comunes. Así, se ha descrito que el mRNA de β -actina está regulado por IMP1 (Ross y cols., 1997) y por HuR (Dormoy-Raclet y cols., 2007); el de c-Myc por IMP1 (Doyle y cols., 1998), por G3BP (Tourriere y cols., 2001) y por HuR (Ma y cols., 1996); y el de MyoD por NF90 (Shi y cols., 2005) y por HuR (van der Giessen y cols., 2003). Por otro lado, actualmente se están llevando a cabo análisis de comparación de las secuencias de todos los RNAs que inmunoprecipitan con una determinada RNABP (ribonómica) con objeto de determinar experimentalmente el elemento de secuencia diana (Gerber y cols., 2004; Lopez de Silanes y cols., 2004; Jonson y cols., 2007). Ante la ausencia de una secuencia consenso convincente, los resultados de estos análisis se presentan en forma de matrices de probabilidad degeneradas que, en ocasiones, pueden encontrarse varias veces en un solo mRNA. Éste es el caso del elemento de unión a HuR (Lopez de Silanes y cols., 2004), que se puede encontrar

dos veces sólo en el 3'UTR de β -mRNA, un tramo de secuencia de 150 nt (Fig. 9A). Además, las aproximaciones ribonómicas han puesto de manifiesto que una sola RNABP puede interaccionar con una población de RNA enorme, llegando a representar entre el 3-10% del transcriptoma. Fruto de la comparación entre dicha población y el transcriptoma (*Gene Ontology*), se ha concluido que determinadas RNABPs regulan de forma conjunta la expresión de mRNAs de proteínas que están implicadas en un proceso común (Gerber y cols., 2004; Lopez de Silanes y cols., 2004; Gama-Carvalho y cols., 2006; Beitzinger y cols., 2007; Jonson y cols., 2007). Por la semejanza de este hallazgo con la regulación coordinada de la expresión de genes implicados en la misma ruta metabólica que se da en bacterias, Keene y Tenenbaum han propuesto la teoría del operón post-transcripcional como un mecanismo de respuesta rápida y coordinada de la expresión génica ante determinados estímulos (Keene y Tenenbaum, 2002).

En resumen, estos datos sugieren que el pre-mRNA naciente se asocia con una serie de factores, RNABPs y posiblemente RNAs, dando lugar a una RNP. La RNP constituye un núcleo dinámico que está sujeto al proceso de regulación post-transcripcional. En concreto, experimenta la asociación y disociación regulada de factores: RNAs reguladores y catalíticos, RNABPs, enzimas, adaptadores, transportadores, etc. La estructura de la RNP se puede modificar por la acción de helicasas y/o por modificaciones post-traduccionales de sus componentes. La RNP cambia de localización subcelular, se ancla en determinados dominios y controla la iniciación de la traducción de los mRNAs que lleva asociados. Por lo tanto, la reconstrucción de la interacción RNA-proteína fuera del contexto celular puede no ser factible. De hecho, nosotros no hemos sido capaces de recapitular la interacción *in vitro* con β -mRNA de algunas de las proteínas que hemos identificado. Sistemas más fisiológicos, como la microinyección, tampoco han conseguido reproducir la regulación del gen endógeno (Lopez de Heredia y Jansen, 2004), lo que sugiere que la historia de la RNP condiciona el destino metabólico y, en definitiva, la expresión del mRNA. De forma coherente, no es posible sobre-expresar en células de mamífero el cDNA de β -F1-ATPasa debido a la inhibición de la traducción del mRNA ectópico. Ni siquiera cuando se incluyen las regiones 5' y 3' UTR y los intrones 2 y 3 del mRNA se consigue expresar la construcción (datos no mostrados), lo que sugiere que la historia del mRNA define su traducción.

2.3. Relevancia fisiológica de las β -mRNABPs identificadas

Como acabamos de discutir, las RNPs constituyen un sistema muy dinámico ya que las asociaciones entre los factores implicados y los mRNAs son transitorias y circunstanciales. Es decir, su destino metabólico depende de estímulos que se traducen en modificaciones de la arquitectura molecular de la RNP. Esto permite una regulación coordinada, flexible y versátil de la expresión génica que da una respuesta rápida a cambios en las condiciones del sistema. La base molecular modular de las interacciones RNA-proteína y proteína-proteína que conforman la RNP otorga la versatilidad a este sistema de regulación. En último término, esta versatilidad da lugar a un sistema robusto con elementos redundantes capaz de su propia autorregulación. En este sentido, resulta difícil la interpretación de los resultados de experimentos clásicos diseñados para determinar la influencia específica de un factor en la expresión de β -F1-ATPasa. Así, la sobre-expresión en sistemas celulares de algunas de estas proteínas puede dar lugar a efectos sobre una población concreta de mRNAs o sobre la maquinaria post-transcripcional general. De la misma forma, la represión de la expresión de una RNABP por siRNA puede generar alteraciones en la expresión de multitud de genes. Por ejemplo, en los últimos años se han publicado multitud de trabajos en los que se describe que HuR interacciona con un mRNA y que el silenciamiento de HuR afecta a la expresión de ese gen (ver revisiones sobre algunos ejemplos recientes (Lopez de Silanes y cols., 2005; Abdelmohsen y cols., 2007)). A pesar de que en esta tesis no se muestran experimentos de RNAi de HuR, nuestros resultados sugieren que HuR afecta a la síntesis global de proteínas sin presentar un efecto específico sobre la expresión de β -F1-ATPasa, en contraste con lo propuesto por otros autores (Izquierdo, 2006). Todo parece indicar que HuR está desempeñando un papel general en el control de la expresión de muchos genes, de tal manera que podría ser considerado un factor *cuasi-canónico* de la regulación post-transcripcional (Lopez de Silanes y cols., 2004; Lopez de Silanes y cols., 2005). Por otro lado, los efectos tanto de la sobre-expresión como del silenciamiento pueden ser compensados por la redundancia funcional de los elementos que componen la RNP. En este sentido, sólo la sobre-expresión de G3BP tiene un efecto claro en la síntesis *in vivo* de β -F1-ATPasa, mientras que IMP1, G3BP y NPM inhiben muy significativamente la traducción *in vitro* de β -mRNA.

In vivo, las alteraciones en las proteínas que hemos identificado se han observado en diversos tipos de tumores humanos (Tabla D1). La asociación entre la alteración de la expresión de alguna de estas proteínas con el desarrollo de un

tipo concreto de cáncer sugiere que el papel que desempeñan estas proteínas en cada tejido es diferente pudiendo la misma alteración dar lugar a fenotipos muy distintos. Tenemos que destacar especialmente a la nucleofosmina, IMP1, G3BP y HuR, que han sido objeto de un estudio más detallado en esta tesis. La nucleofosmina está sobre-expresada, mutada, implicada en reordenamientos cromosómicos y deletada en diversos tipos de tumores humanos. Parece ser que tanto la ganancia como la pérdida de función de esta proteína es importante para el proceso de carcinogénesis (Grisendi y cols., 2005; Grisendi y cols., 2006). G3BP está sobre-expresada en carcinomas de mama, colon y cabeza y cuello y se ha descrito que puede favorecer la entrada en fase S del ciclo celular (Guitard y cols., 2001). IMP1 (CRD-BP) se expresa durante el desarrollo embrionario y desaparece en tejidos diferenciados (Leeds y cols., 1997). Su expresión vuelve a ser detectable en muchos tumores (Doyle y cols., 2000; Lu y cols., 2001; Ross y cols., 2001) y sus niveles de expresión correlacionan significativamente con un mal pronóstico en pacientes con carcinoma de colon (Dimitriadis y cols., 2007), pulmón (Kato y cols., 2007) y ovario (Kobel y cols., 2007). Además, un modelo animal de sobre-expresión condicionada de IMP1 en tejido mamario promueve el desarrollo de tumores en este tejido y su nivel de expresión correlaciona con la incidencia de los tumores mamarios (Tessier y cols., 2004). Sin embargo, se ha descrito recientemente en carcinomas de mama la existencia de una subpoblación celular con un elevado potencial invasivo que no se divide y es resistente a la apoptosis inducida por quimioterapia tradicional (cisplatino, doxorubicina, etopósido). Sorprendentemente, esta subpoblación presenta niveles de expresión de IMP1 significativamente inferiores a los que presenta el resto de las células del tumor (Wang y cols., 2004). Coherentemente, el silenciamiento de IMP1 con siRNA puede inhibir la proliferación celular (Liao y cols., 2004).

HuR se expresa de forma ubicua y su expresión está significativamente elevada en muchos tumores (Fig. 11) (Lopez de Silanes y cols., 2003). Se ha descrito que la expresión citoplasmática de HuR en carcinomas de mama (Heinonen y cols., 2005), estómago (Mrena y cols., 2005) y ovario (Erkinheimo y cols., 2003) está relacionada con un peor pronóstico de los pacientes. Nosotros hemos demostrado la existencia de un sub-conjunto de pacientes con carcinoma de mama que presentan una menor expresión de HuR y que tienen una mayor probabilidad de recidiva. Puesto que HuR es un regulador positivo de la proliferación y controla la expresión de proteínas clave en el ciclo celular (Wang y cols., 2000; Kullmann y cols., 2002; Abdelmohsen y cols., 2007), es posible que este subconjunto de pacientes, aunque presenten una tasa de proliferación menor, tengan mayor

potencial metastático, como es el caso de las células tumorales que presentan menores niveles de IMP1 (Wang y cols., 2004).

Sorprendentemente, se ha descrito un efecto muy semejante en células gigantes tumorales de pulmón, en las que existe una sobre-expresión de G3BP que se pierde cuando éstas adquieren el potencial metastático (Liu y cols., 2001). Llama la atención la semejanza entre IMP1, HuR y G3BP, ya que las tres están sobre-expresadas cuando se compara frente al tejido normal y, sin embargo, un nivel de expresión menor de estas proteínas en el carcinoma identifica un tipo de carcinomas con mayor probabilidad de metastatizar. Sería interesante comprobar si se trata de la misma población de células o si el patrón de expresión de estas RNABPs multifuncionales conduce al fenotipo metastático a través de la misma vía. Por otro lado, la actividad inhibidora sobre la traducción *in vitro* de β -mRNA por parte de IMP1, G3BP y NPM puede ser coherente con su sobre-expresión en cáncer, aunque la relevancia de estas proteínas en la regulación de la expresión de β -F1-ATPasa está aún por ser determinada.

En definitiva, para comprender mejor cómo se regula la expresión post-transcripcional de β -mRNA quizá sea más informativo el estudio de las alteraciones que se producen en el interactoma de β -mRNA en distintas condiciones experimentales en un sistema *in vivo*. El microambiente tumoral está sometido a multitud de estímulos, incluidos la hipoxia, el estrés metabólico, el estrés oxidativo, la acidificación, etc. En estas situaciones se produce la reprogramación metabólica, que se concreta en la alteración del proteoma mitocondrial y glucolítico (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2004; Isidoro y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005) y del fenotipo bioenergético de las células cancerosas (Lopez-Rios y cols., 2007). Teniendo en cuenta que estos estímulos promueven cambios en la maquinaria de regulación post-transcripcional de la célula (Wang y cols., 2004; Kedersha y cols., 2005; Lopez de Silanes y cols., 2005; Abdelmohsen y cols., 2007) y que se observa la alteración coordinada de la expresión de genes relacionados funcionalmente (Keene y Tenenbaum, 2002), sería muy estimulante estudiar la composición del *operón* de β -mRNA en respuesta a este tipo de estímulos. Con este objetivo, hemos generado un modelo celular en el que β -mRNA lleva una etiqueta de afinidad, de tal manera que se puede estudiar su localización subcelular en tiempo real y se puede llevar a cabo la purificación bioquímica de la RNP en que está integrado. En este modelo, hemos comprobado (i) que β -mRNA se localiza en estructuras citoplasmáticas de gran tamaño de acuerdo con resultados previos (Egea y cols.,

1997; Ricart y cols., 1997) y (ii) que existe una fuerte represión traduccional de β -mRNA ectópico que modela la que podría estar produciéndose en algunos tipos de tumores. Con este modelo, creemos que será posible analizar el proteoma y el ribonoma de la β -mRNA-RNP en esta y otras situaciones experimentales y, en especial, en respuesta a aquellos estímulos propios del ambiente en que se desarrolla un tumor.

2.4. β -mRNA-RNP y citoesqueleto

Las células están divididas en distintos compartimentos subcelulares. Una de las estrategias celulares para asegurar el complemento proteico que especifica la subdivisión funcional y las propiedades de cada compartimento es el direccionamiento específico de mRNAs para que sean traducidos de forma localizada. Ejemplos notables de esta estrategia están representados por la mitocondria, el retículo endoplasmático y los extremos de células polarizadas como neuronas o fibroblastos. En el caso concreto de β -F1-RNP, hemos descrito previamente su asociación a la mitocondria, lo que sugiere la relevancia de la localización con la traducción.

Hemos descrito que la β -F1-RNP es una partícula muy dinámica en cuanto a su composición y su localización subcelular y, utilizando el sistema de purificación de β -mRNABPs *in vivo*, hemos identificado a la α -actinina (una proteína asociada a microfilamentos, MFs) y a la vimentina, una proteína sillar de los filamentos intermedios (IFs) (Fig. 35 y Tabla 5). En diversos sistemas experimentales se ha descrito que el transporte de RNPs se lleva a cabo a través de microtúbulos mediante motores de kinesina y dineína o a través de MFs de actina mediante la participación de motores de miosina (Lopez de Heredia y Jansen, 2004). Por otro lado, el anclaje de mRNAs en determinados dominios subcelulares se lleva a cabo a través de MFs y IFs. Por ejemplo, la localización de *oskar* en el polo posterior durante la determinación del patrón antero-posterior en *Drosophila* depende del anclaje del mRNA a una red de MFs en el que tropomiosina 2 es esencial (Erdelyi y cols., 1995). El anclaje de Vg1 en el polo vegetativo del oocito en *Xenopus* se produce a través de una red de IFs (Alarcon y Elinson, 2001).

Los IFs están implicados en el direccionamiento específico de las proteínas propias de la mitocondria o el retículo endoplasmático (Toivola y cols., 2005). Experimentos

de fraccionamiento subcelular revelan la ausencia de polisomas en fracciones ricas en IFs (van Venrooij y cols., 1981). Asimismo, por inmunomicroscopía confocal se ha demostrado la colocalización de IFs con ribosomas aislados pero no con polisomas (Traub y cols., 1998). Teniendo en cuenta que la vimentina presenta afinidad por oligonucleótidos (Hartig y cols., 1997), es posible que el citoesqueleto de vimentina funcione como un sitio de almacenamiento de mRNAs mitocondriales asociados a ribosomas aislados y traduccionalmente inactivos. Esto originaría que en las células C4, que se transcribe una gran cantidad de β -mRNA (Fig. 31) que aparentemente es localizado en una estructura celular (Fig. 33) semejante a la caracterizada previamente (Egea y cols., 1997; Ricart y cols., 1997), el mRNA se acumule traduccionalmente reprimido. Además, experimentos de fraccionamiento subcelular y de microscopía confocal en varias líneas celulares han demostrado que la vimentina co-localiza con las mitocondrias y que su abundancia en la fracción mitocondrial es muy superior a la de actina o tubulina (Tang y cols., 2007). Además, MEFs obtenidos de ratones KO para vimentina presentan mitocondrias desestructuradas y desacopladas cuando se comparan con las de MEFs obtenidos de ratones wt (Tolstonog y cols., 2005). Asimismo, el silenciamiento de vimentina mediante siRNA en varias líneas celulares promueve la fragmentación de la retícula mitocondrial (Tang y cols., 2007). En este punto, sería muy interesante comprobar si estas alteraciones morfológicas y funcionales están provocadas directa o indirectamente por una deficiencia en el direccionamiento y acumulación de β -mRNA en la mitocondria, dada la implicación de F0-F1-ATPasa en la formación de crestas mitocondriales (Paumard y cols., 2002) y su relevancia en las funciones bioenergética (Valcarce y cols., 1988; Luis y cols., 1993; Izquierdo y cols., 1995) y reguladora de la muerte celular (Santamaria y cols., 2006).

Por otro lado, se ha descrito que, dependiendo del tipo celular, el desplazamiento de la mitocondria se puede llevar a cabo a través de microtúbulos (Rojo y cols., 1998) o de MFs, mientras que el anclaje se da a través de una red de MFs (Boldogh y Pon, 2007). Este resultado podría explicar la co-purificación de α -actinina con β -mRNA. De hecho, Puf3 es una RNA-BP de levaduras que interacciona casi exclusivamente con mRNAs que codifican proteínas mitocondriales (Gerber y cols., 2004) y se localiza en la periferia mitocondrial interaccionando con el complejo nucleador de MFs Arp2/3 (Garcia-Rodriguez y cols., 2007).

CONCLUSIONES

1. La expresión relativa de β -F1-ATPasa, marcador que define la huella bioenergética, está disminuida en carcinomas basocelulares de piel y en adenocarcinomas y carcinomas escamosos de pulmón aparentemente mediante mecanismos específicos de represión de la traducción de su mRNA.
2. La pérdida de expresión de β -F1-ATPasa está asociada significativamente con el aumento de la tasa de captación de glucosa en carcinomas de pulmón, estimada mediante tomografía de emisión de positrones usando ^{18}F FDG como trazador. Tanto la expresión de β -F1-ATPasa, como la captación de glucosa en las células del tumor son parámetros independientes que predicen el pronóstico de los pacientes.
3. Se ha desarrollado una técnica de cromatografía de afinidad muy eficiente para la purificación de proteínas de unión a RNA.
4. Se ha demostrado que HuR interacciona *in vitro* e *in vivo* con la región 3' no traducible del mRNA de β -F1-ATPasa, estando su expresión en carcinomas de mama asociada con la alteración de la huella bioenergética del tumor. Sin embargo, no se han encontrado evidencias funcionales de la implicación directa de HuR en el control de la expresión del mensajero de β -F1-ATPasa en células humanas. HuR es, por otro lado, un marcador independiente para el pronóstico de las pacientes con carcinoma de mama.
5. Se han purificado e identificado nueve proteínas de unión al RNA de β -F1-ATPasa (DHX9, SFPQ, NonO, nucleolina, nucleofosmina, ILF3, G3BP, IMP1 y HuR) como proteínas que participan en la formación de la β -F1-RNP. Se ha estudiado la participación funcional de G3BP, IMP1 y NPM en la expresión del mRNA de β -F1-ATPasa. G3BP inhibe específicamente la traducción del mRNA de β -F1-ATPasa *in vitro* e *in vivo*, mientras que IMP1 y NPM sólo presentan esta actividad inhibidora en el sistema *in vitro*, sugiriendo la complejidad de la regulación post-transcripcional de la expresión de β -F1-ATPasa *in vivo*.

Conclusiones

6. Aprovechando que las células de mamífero presentan mecanismos de represión de la traducción del mRNA de β -F1-ATPasa cuando éste se sobre-expresa de forma ectópica hemos co-purificado con el mRNA de β -F1-ATPasa, de células *in vivo*, α -actinina y vimentina, dos proteínas del citoesqueleto. Estos resultados sugieren la implicación de la red de microfilamentos y filamentos intermedios en la localización/traducción del mensajero de β -F1-ATPasa.

7. La sobre-expresión de IF1, inhibidor fisiológico de la H^+ -ATP sintasa, y de su forma mutante inhibe la actividad ATP sintetasa de la H^+ -ATP sintasa y promueve la alteración del fenotipo metabólico de la célula. Este resultado sugiere la posible utilidad de IF1 y H49K para el desarrollo de modelos animales de interferencia con la fosforilación oxidativa.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelhaleem M, Maltais L, Wain H** (2003). The human DDX and DHX gene families of putative RNA helicases. *Genomics* 81: 618-22.
- Abdelmohsen K, Lal A, Kim HH, Gorospe M** (2007). Posttranscriptional orchestration of an anti-apoptotic program by HuR. *Cell Cycle* 6: 1288-92.
- Abdelmohsen K, Pullmann R, Jr., Lal A, Kim HH, Galban S, Yang X, Blethrow JD, Walker M, Shubert J, Gillespie DA, Furneaux H, Gorospe M** (2007). Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell* 25: 543-57.
- Acebo P, Giner-Sanchez D, Calvo P, Blanco-Rivero A, Ortega AD, Roncador G, Fernandez PL, Fernandez-Malavé E, Cuezva JM** (2008). Quantitation of the bioenergetic signature of cancer. *Nature Methods* Submitted.
- Alarcon VB, Elinson RP** (2001). RNA anchoring in the vegetal cortex of the *Xenopus* oocyte. *J Cell Sci* 114: 1731-41.
- Angelov D, Bondarenko VA, Almagro S, Menoni H, Mongelard F, Hans F, Mietton F, Studitsky VM, Hamiche A, Dimitrov S, Bouvet P** (2006). Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *EMBO J* 25: 1669-79.
- Atlas R, Behar L, Sapoznik S, Ginzburg I** (2007). Dynamic association with polysomes during P19 neuronal differentiation and an untranslated-region-dependent translation regulation of the tau mRNA by the tau mRNA-associated proteins IMP1, HuD, and G3BP1. *J Neurosci Res* 85: 173-83.
- Baggetto LG** (1992). Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie* 74: 959-74.
- Bardwell VJ, Wickens M** (1990). Purification of RNA and RNA-protein complexes by an R17 coat protein affinity method. *Nucleic Acids Res* 18: 6587-94.
- Beitzinger M, Peters L, Zhu JY, Kremmer E, Meister G** (2007). Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes. *RNA Biol* 4: 76-84.
- Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, Rossignol R** (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci* 120: 838-48.
- Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH** (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126: 107-20.
- Bevington JM, Needham PG, Verrill KC, Collaco RF, Basrur V, Trempe JP** (2007). Adeno-associated virus interactions with B23/Nucleophosmin: identification of sub-nucleolar virion regions. *Virology* 357: 102-13.

- Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, Ladd C, Beheshti J, Bueno R, Gillette M, Loda M, Weber G, Mark EJ, Lander ES, Wong W, Johnson BE, Golub TR, Sugarbaker DJ, Meyerson M** (2001). Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13790-5.
- Bi X, Lin Q, Foo TW, Joshi S, You T, Shen HM, Ong CN, Cheah PY, Eu KW, Hew CL** (2006). Proteomic analysis of colorectal cancer reveals alterations in metabolic pathways: mechanism of tumorigenesis. *Mol Cell Proteomics* 5: 1119-30.
- Biswas G, Adebajo OA, Freedman BD, Anandatheerthavarada HK, Vijayasarathy C, Zaidi M, Kotlikoff M, Avadhani NG** (1999). Retrograde Ca²⁺ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *EMBO J* 18: 522-33.
- Boldogh IR, Pon LA** (2007). Mitochondria on the move. *Trends Cell Biol* 17: 502-10.
- Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA** (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56: 379-90.
- Boyer PD** (1997). The ATP synthase. A splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 717-749.
- Brand KA, Hermfisse U** (1997). Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *Faseb J* 11: 388-95.
- Bravo C, Minauro-Sanmiguel F, Morales-Rios E, Rodriguez-Zavala JS, Garcia JJ** (2004). Overexpression of the inhibitor protein IF(1) in AS-30D hepatoma produces a higher association with mitochondrial F(1)F(0) ATP synthase compared to normal rat liver: functional and cross-linking studies. *J Bioenerg Biomembr* 36: 257-64.
- Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, Vercauteren K, Tiranti V, Zeviani M, Scarpulla RC, Chandel NS** (2005). Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 1: 409-14.
- Cabezón E, Butler PJ, Runswick MJ, Walker JE** (2000). Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *J Biol Chem* 275: 25460-4.
- Capuano F, Varone D, D'Eri N, Russo E, Tommasi S, Montemurro S, Prete F, Papa S** (1996). Oxidative phosphorylation and F(O)F(1) ATP synthase activity of human hepatocellular carcinoma. *Biochem Mol Biol Int* 38: 1013-22.
- Carew JS, Huang P** (2002). Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* 1: 9.
- Coradini D, Daidone MG** (2004). Biomolecular prognostic factors in breast cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 16: 49-55.

- Cuezva JM, Chen G, Alonso AM, Isidoro A, Misek DE, Hanash SM, Beer DG** (2004). The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis* 25: 1157-63.
- Cuezva JM, Chitra CI, Patel MS** (1982). The newborn of diabetic rat. II. Impaired gluconeogenesis in the postnatal period. *Pediatr Res* 16: 638-43.
- Cuezva JM, Krajewska M, de Heredia ML, Krajewski S, Santamaria G, Kim H, Zapata JM, Marusawa H, Chamorro M, Reed JC** (2002). The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 62: 6674-81.
- Cuezva JM, Ostronoff LK, Ricart J, Lopez de Heredia M, Di Liegro CM, Izquierdo JM** (1997). Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *J Bioenerg Biomembr* 29: 365-77.
- Cuezva JM, Sanchez-Arago M, Sala S, Blanco-Rivero A, Ortega AD** (2007). A message emerging from development: the repression of mitochondrial beta-F1-ATPase expression in cancer. *J Bioenerg Biomembr* 39: 259-65.
- Chen YI, Moore RE, Ge HY, Young MK, Lee TD, Stevens SW** (2007). Proteomic analysis of in vivo-assembled pre-mRNA splicing complexes expands the catalog of participating factors. *Nucleic Acids Res* 35: 3928-44.
- Chen Z, Odstrcil EA, Tu BP, McKnight SL** (2007). Restriction of DNA replication to the reductive phase of the metabolic cycle protects genome integrity. *Science* 316: 1916-9.
- Christian S, Pilch J, Akerman ME, Porkka K, Laakkonen P, Ruoslahti E** (2003). Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J Cell Biol* 163: 871-8.
- Dang CV, Kim JW, Gao P, Yustein J** (2008). The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer* 8: 51-6.
- Dang CV, Semenza GL** (1999). Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 24: 68-72.
- de Heredia ML, Izquierdo JM, Cuezva JM** (2000). A conserved mechanism for controlling the translation of beta-F1-ATPase mRNA between the fetal liver and cancer cells. *J Biol Chem* 275: 7430-7.
- DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, Thompson CB** (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19345-50.
- Dey R, Moraes CT** (2000). Lack of oxidative phosphorylation and low mitochondrial membrane potential decrease susceptibility to apoptosis and do not modulate the protective effect of Bcl-x(L) in osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 275: 7087-94.

- Di Liegro CM, Bellafiore M, Izquierdo JM, Rantanen A, Cuezva JM** (2000). 3'-untranslated regions of oxidative phosphorylation mRNAs function in vivo as enhancers of translation. *Biochem J* 352 Pt 1: 109-15.
- Dimitriadis E, Trangas T, Milatos S, Foukas PG, Gioulbasanis I, Courtis N, Nielsen FC, Pandis N, Dafni U, Bardi G, Ioannidis P** (2007). Expression of oncofetal RNA-binding protein CRD-BP/IMP1 predicts clinical outcome in colon cancer. *Int J Cancer* 121: 486-94.
- Dormoy-Raclet V, Menard I, Clair E, Kurban G, Mazroui R, Di Marco S, von Roretz C, Pause A, Gallouzi IE** (2007). The RNA-binding protein HuR promotes cell migration and cell invasion by stabilizing the beta-actin mRNA in a U-rich-element-dependent manner. *Mol Cell Biol* 27: 5365-80.
- Doyle GA, Betz NA, Leeds PF, Fleisig AJ, Prokipcak RD, Ross J** (1998). The c-myc coding region determinant-binding protein: a member of a family of KH domain RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* 26: 5036-44.
- Doyle GA, Bourdeau-Heller JM, Coulthard S, Meisner LF, Ross J** (2000). Amplification in human breast cancer of a gene encoding a c-myc mRNA-binding protein. *Cancer Res* 60: 2756-9.
- Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ** (1995). Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J Biol Chem* 270: 29083-9.
- Egea G, Izquierdo JM, Ricart J, San Martin C, Cuezva JM** (1997). mRNA encoding the beta-subunit of the mitochondrial F1-ATPase complex is a localized mRNA in rat hepatocytes. *Biochem J* 322 (Pt 2): 557-65.
- Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB** (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 64: 3892-9.
- Elvira G, Wasiak S, Blandford V, Tong XK, Serrano A, Fan X, del Rayo Sanchez-Carbente M, Servant F, Bell AW, Boismenu D, Lacaille JC, McPherson PS, DesGroseillers L, Sossin WS** (2006). Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol Cell Proteomics* 5: 635-51.
- Emili A, Shales M, McCracken S, Xie W, Tucker PW, Kobayashi R, Blencowe BJ, Ingles CJ** (2002). Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54nrb/nonO bind to the RNA polymerase II CTD. *Rna* 8: 1102-11.
- Eng C, Kiuru M, Fernandez MJ, Aaltonen LA** (2003). A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nat Rev Cancer* 3: 193-202.
- Erdelyi M, Michon AM, Guichet A, Glotzer JB, Ephrussi A** (1995). Requirement for Drosophila cytoplasmic tropomyosin in oskar mRNA localization. *Nature* 377: 524-7.

- Erkinheimo TL, Lassus H, Sivula A, Sengupta S, Furneaux H, Hla T, Haglund C, Butzow R, Ristimäki A** (2003). Cytoplasmic HuR expression correlates with poor outcome and with cyclooxygenase 2 expression in serous ovarian carcinoma. *Cancer Res* 63: 7591-4.
- Fackenthal JD, Olopade OI** (2007). Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer* 7: 937-48.
- Fantin VR, St-Pierre J, Leder P** (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9: 425-34.
- Fox AH, Lam YW, Leung AK, Lyon CE, Andersen J, Mann M, Lamond AI** (2002). Paraspeckles: a novel nuclear domain. *Curr Biol* 12: 13-25.
- Fujii R, Okamoto M, Aratani S, Oishi T, Ohshima T, Taira K, Baba M, Fukamizu A, Nakajima T** (2001). A Role of RNA Helicase A in cis-Acting Transactivation Response Element-mediated Transcriptional Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Biol Chem* 276: 5445-51.
- Gallouzi IE, Parker F, Chebli K, Maurier F, Labourier E, Barlat I, Capony JP, Tocque B, Tazi J** (1998). A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability. *Mol Cell Biol* 18: 3956-65.
- Gama-Carvalho M, Barbosa-Morais NL, Brodsky AS, Silver PA, Carmo-Fonseca M** (2006). Genome-wide identification of functionally distinct subsets of cellular mRNAs associated with two nucleocytoplasmic-shuttling mammalian splicing factors. *Genome Biol* 7: R113.
- Garber K** (2006). Energy deregulation: licensing tumors to grow. *Science* 312: 1158-9.
- Garcia-Rodriguez LJ, Gay AC, Pon LA** (2007). Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast. *J Cell Biol* 176: 197-207.
- Garesse R, Vallejo CG** (2001). Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* 263: 1-16.
- Gatenby RA, Gillies RJ** (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4: 891-9.
- Gerber AP, Herschlag D, Brown PO** (2004). Extensive association of functionally and cytologically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biol* 2: E79.
- Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P** (1999). Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* 112 (Pt 6): 761-72.

- Gloeckler Ries LA, Reichman ME, Lewis DR, Hankey BF, Edwards BK** (2003). Cancer survival and incidence from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program. *Oncologist* 8: 541-52.
- Govindarajan B, Sligh JE, Vincent BJ, Li M, Canter JA, Nickoloff BJ, Rodenburg RJ, Smeitink JA, Oberley L, Zhang Y, Slingerland J, Arnold RS, Lambeth JD, Cohen C, Hilenski L, Griendling K, Martinez-Diez M, Cuezva JM, Arbiser JL** (2007). Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. *J Clin Invest* 117: 719-29.
- Green DW, Grover GJ** (2000). The IF(1) inhibitor protein of the mitochondrial F(1)F(0)-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1458: 343-55.
- Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, Cheng K, Khandker L, Manova K, Pandolfi PP** (2005). Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* 437: 147-53.
- Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP** (2006). Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 493-505.
- Guitard E, Parker F, Millon R, Abecassis J, Tocque B** (2001). G3BP is overexpressed in human tumors and promotes S phase entry. *Cancer Lett* 162: 213-21.
- Gullino PM, Grantham FH, Courtney AH** (1967). Glucose consumption by transplanted tumors in vivo. *Cancer Res* 27: 1031-40.
- Gwizdek C, Ossareh-Nazari B, Brownawell AM, Evers S, Macara IG, Dargemont C** (2004). Minihelix-containing RNAs mediate exportin-5-dependent nuclear export of the double-stranded RNA-binding protein ILF3. *J Biol Chem* 279: 884-91.
- Hanahan D, Weinberg RA** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hansen TV, Hammer NA, Nielsen J, Madsen M, Dalbaeck C, Wewer UM, Christiansen J, Nielsen FC** (2004). Dwarfism and impaired gut development in insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 24: 4448-64.
- Hara T, Honda K, Shitashige M, Ono M, Matsuyama H, Naito K, Hirohashi S, Yamada T** (2007). Mass spectrometry analysis of the native protein complex containing actinin-4 in prostate cancer cells. *Mol Cell Proteomics* 6: 479-91.
- Hartig R, Huang Y, Janetzko A, Shoeman R, Grub S, Traub P** (1997). Binding of fluorescence- and gold-labeled oligodeoxyribonucleotides to cytoplasmic intermediate filaments in epithelial and fibroblast cells. *Exp Cell Res* 233: 169-86.
- Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, Dhanak D, Hingorani SR, Tuveson DA, Thompson CB** (2005). ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* 8: 311-21.

- Havin L, Git A, Elisha Z, Oberman F, Yaniv K, Schwartz SP, Standart N, Yisraeli JK** (1998). RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament-based RNA localization. *Genes Dev* 12: 1593-8.
- Heinonen M, Bono P, Narko K, Chang SH, Lundin J, Joensuu H, Furneaux H, Hla T, Haglund C, Ristimäki A** (2005). Cytoplasmic HuR expression is a prognostic factor in invasive ductal breast carcinoma. *Cancer Res* 65: 2157-61.
- Hervouet E, Demont J, Pecina P, Vojtiskova A, Houstek J, Simonnet H, Godinot C** (2005). A new role for the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: stimulation of mitochondrial oxidative phosphorylation complex biogenesis. *Carcinogenesis* 26: 531-9.
- Hiscox JA** (2007). RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat Rev Microbiol* 5: 119-27.
- Hock J, Weinmann L, Ender C, Rudel S, Kremmer E, Raabe M, Urlaub H, Meister G** (2007). Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep* 8: 1052-60.
- Holm E, Hagmuller E, Staedt U, Schlickeiser G, Gunther HJ, Leweling H, Tokus M, Kollmar HB** (1995). Substrate balances across colonic carcinomas in humans. *Cancer Res* 55: 1373-8.
- Huttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dichtenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH** (2005). Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* 438: 512-5.
- Isidoro A, Casado E, Redondo A, Acebo P, Espinosa E, Alonso AM, Cejas P, Hardisson D, Fresno Vara JA, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M, Cuezva JM** (2005). Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* 26: 2095-104.
- Isidoro A, Martinez M, Fernandez PL, Ortega AD, Santamaria G, Chamorro M, Reed JC, Cuezva JM** (2004). Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J* 378: 17-20.
- Isken O, Baroth M, Grassmann CW, Weinlich S, Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Behrens SE** (2007). Nuclear factors are involved in hepatitis C virus RNA replication. *Rna* 13: 1675-92.
- Izquierdo JM** (2006). Control of the ATP synthase beta subunit expression by RNA-binding proteins TIA-1, TIAR, and HuR. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 703-11.
- Izquierdo JM, Cuezva JM** (1993). Evidence of post-transcriptional regulation in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 55-60.

- Izquierdo JM, Cuezva JM** (1997). Control of the translational efficiency of beta-F1-ATPase mRNA depends on the regulation of a protein that binds the 3' untranslated region of the mRNA. *Mol Cell Biol* 17: 5255-68.
- Izquierdo JM, Cuezva JM** (2000). Internal-ribosome-entry-site functional activity of the 3'-untranslated region of the mRNA for the beta subunit of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Biochem J* 346 Pt 3: 849-55.
- Izquierdo JM, Cuezva JM** (2005). Epigenetic regulation of the binding activity of translation inhibitory proteins that bind the 3' untranslated region of beta-F1-ATPase mRNA by adenine nucleotides and the redox state. *Arch Biochem Biophys* 433: 481-6.
- Izquierdo JM, Luis AM, Cuezva JM** (1990). Postnatal mitochondrial differentiation in rat liver. Regulation by thyroid hormones of the beta-subunit of the mitochondrial F1-ATPase complex. *J Biol Chem* 265: 9090-7.
- Izquierdo JM, Ricart J, Ostronoff LK, Egea G, Cuezva JM** (1995). Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of beta-F1-ATPase gene expression during mitochondrial biogenesis in liver. *J Biol Chem* 270: 10342-50.
- Izumi RE, Valdez B, Banerjee R, Srivastava M, Dasgupta A** (2001). Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res* 76: 17-29.
- Jaeger S, Eriani G, Martin F** (2004). Results and prospects of the yeast three-hybrid system. *FEBS Lett* 556: 7-12.
- Jankowsky E, Bowers H** (2006). Remodeling of ribonucleoprotein complexes with DExH/D RNA helicases. *Nucleic Acids Res* 34: 4181-8.
- Jeyaraj S, Dakhlallah D, Hill SR, Lee BS** (2005). HuR stabilizes vacuolar H⁺-translocating ATPase mRNA during cellular energy depletion. *J Biol Chem* 280: 37957-64.
- Jonson L, Vikesaa J, Krogh A, Nielsen LK, Hansen T, Borup R, Johnsen AH, Christiansen J, Nielsen FC** (2007). Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules. *Mol Cell Proteomics* 6: 798-811.
- Jurica MS, Licklider LJ, Gygi SR, Grigorieff N, Moore MJ** (2002). Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *Rna* 8: 426-39.
- Kallinowski F, Vaupel P, Runkel S, Berg G, Fortmeyer HP, Baessler KH, Wagner K, Mueller-Klieser W, Walenta S** (1988). Glucose uptake, lactate release, ketone body turnover, metabolic micromilieu, and pH distributions in human breast cancer xenografts in nude rats. *Cancer Res* 48: 7264-72.
- Kameoka S, Duque P, Konarska MM** (2004). p54(nrb) associates with the 5' splice site within large transcription/splicing complexes. *EMBO J* 23: 1782-91.

- Kaneko S, Rozenblatt-Rosen O, Meyerson M, Manley JL** (2007). The multifunctional protein p54nrb/PSF recruits the exonuclease XRN2 to facilitate pre-mRNA 3' processing and transcription termination. *Genes Dev* 21: 1779-89.
- Kato T, Hayama S, Yamabuki T, Ishikawa N, Miyamoto M, Ito T, Tsuchiya E, Kondo S, Nakamura Y, Daigo Y** (2007). Increased expression of insulin-like growth factor-II messenger RNA-binding protein 1 is associated with tumor progression in patients with lung cancer. *Clin Cancer Res* 13: 434-42.
- Katsafanas GC, Moss B** (2007). Colocalization of transcription and translation within cytoplasmic poxvirus factories coordinates viral expression and subjugates host functions. *Cell Host Microbe* 2: 221-8.
- Katsanou V, Papadaki O, Milatos S, Blackshear PJ, Anderson P, Kollias G, Kontoyiannis DL** (2005). HuR as a negative posttranscriptional modulator in inflammation. *Mol Cell* 19: 777-89.
- Kedersha N, Chen S, Gilks N, Li W, Miller IJ, Stahl J, Anderson P** (2002). Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol Biol Cell* 13: 195-210.
- Kedersha N, Cho MR, Li W, Yacono PW, Chen S, Gilks N, Golan DE, Anderson P** (2000). Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J Cell Biol* 151: 1257-68.
- Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE, Anderson P** (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 169: 871-84.
- Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P** (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol* 147: 1431-42.
- Keene JD** (2007). RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* 8: 533-43.
- Keene JD, Tenenbaum SA** (2002). Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol Cell* 9: 1161-7.
- Khandjian EW, Huot ME, Tremblay S, Davidovic L, Mazroui R, Bardoni B** (2004). Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13357-62.
- Kim JW, Dang CV** (2006). Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res* 66: 8927-30.

- Klevecz RR, Bolen J, Forrest G, Murray DB** (2004). A genomewide oscillation in transcription gates DNA replication and cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1200-5.
- Kobel M, Weidensdorfer D, Reinke C, Lederer M, Schmitt WD, Zeng K, Thomssen C, Hauptmann S, Huttelmaier S** (2007). Expression of the RNA-binding protein IMP1 correlates with poor prognosis in ovarian carcinoma. *Oncogene* 26: 7584-9.
- Kozak M** (2007). Lessons (not) learned from mistakes about translation. *Gene* 403: 194-203.
- Kulawiec M, Arnouk H, Desouki MM, Kazim L, Still I, Singh KK** (2006). Proteomic analysis of mitochondria-to-nucleus retrograde response in human cancer. *Cancer Biol Ther* 5: 967-75.
- Kullmann M, Gopfert U, Siewe B, Hengst L** (2002). ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Genes Dev* 16: 3087-99.
- Lal A, Mazan-Mamczarz K, Kawai T, Yang X, Martindale JL, Gorospe M** (2004). Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *EMBO J* 23: 3092-102.
- Langland JO, Kao PN, Jacobs BL** (1999). Nuclear factor-90 of activated T-cells: A double-stranded RNA-binding protein and substrate for the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *Biochemistry* 38: 6361-8.
- Lawlor MA, Alessi DR** (2001). PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* 114: 2903-10.
- Leandersson K, Riesbeck K, Andersson T** (2006). Wnt-5a mRNA translation is suppressed by the Elav-like protein HuR in human breast epithelial cells. *Nucleic Acids Res* 34: 3988-99.
- Leeds P, Kren BT, Boylan JM, Betz NA, Steer CJ, Gruppuso PA, Ross J** (1997). Developmental regulation of CRD-BP, an RNA-binding protein that stabilizes c-myc mRNA in vitro. *Oncogene* 14: 1279-86.
- Levy NS, Chung S, Furneaux H, Levy AP** (1998). Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 273: 6417-23.
- Li F, Wang Y, Zeller KI, Potter JJ, Wonsey DR, O'Donnell KA, Kim JW, Yustein JT, Lee LA, Dang CV** (2005). Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol* 25: 6225-34.
- Li YP** (1997). Protein B23 is an important human factor for the nucleolar localization of the human immunodeficiency virus protein Tat. *J Virol* 71: 4098-102.

- Liao B, Patel M, Hu Y, Charles S, Herrick DJ, Brewer G** (2004). Targeted knockdown of the RNA-binding protein CRD-BP promotes cell proliferation via an insulin-like growth factor II-dependent pathway in human K562 leukemia cells. *J Biol Chem* 279: 48716-24.
- Liu Y, Zheng J, Fang W, You J, Wang J, Cui X, Wu B** (2001). Identification of metastasis associated gene G3BP by differential display in human cancer cell sublines with different metastatic potentials G3BP as highly expressed in non-metastatic. *Chin Med J (Engl)* 114: 35-8.
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-8.
- López-Abente GC, Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer CNdE, ISCIII** (2007). La situación del cáncer en España. Madrid, Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Lopez-Rios F, Sanchez-Arago M, Garcia-Garcia E, Ortega AD, Berrendero JR, Pozo-Rodriguez F, Lopez-Encuentra A, Ballestin C, Cuezva JM** (2007). Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res* 67: 9013-7.
- Lopez de Heredia M, Jansen RP** (2004). mRNA localization and the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 16: 80-5.
- Lopez de Silanes I, Fan J, Yang X, Zonderman AB, Potapova O, Pizer ES, Gorospe M** (2003). Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis. *Oncogene* 22: 7146-54.
- Lopez de Silanes I, Galban S, Martindale JL, Yang X, Mazan-Mamczarz K, Indig FE, Falco G, Zhan M, Gorospe M** (2005). Identification and functional outcome of mRNAs associated with RNA-binding protein TIA-1. *Mol Cell Biol* 25: 9520-31.
- Lopez de Silanes I, Lal A, Gorospe M** (2005). HuR: post-transcriptional paths to malignancy. *RNA Biol* 2: 11-3.
- Lopez de Silanes I, Zhan M, Lal A, Yang X, Gorospe M** (2004). Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2987-92.
- Lu H, Li W, Noble WS, Payan D, Anderson DC** (2004). Riboproteomics of the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *J Proteome Res* 3: 949-57.
- Lu M, Nakamura RM, Dent ED, Zhang JY, Nielsen FC, Christiansen J, Chan EK, Tan EM** (2001). Aberrant expression of fetal RNA-binding protein p62 in liver cancer and liver cirrhosis. *Am J Pathol* 159: 945-53.
- Lu Y, Yi Y, Liu P, Wen W, James M, Wang D, You M** (2007). Common human cancer genes discovered by integrated gene-expression analysis. *PLoS ONE* 2: e1149.

- Luciakova K, Kuzela S** (1984). Increased content of natural ATPase inhibitor in tumor mitochondria. *FEBS Lett* 177: 85-8.
- Luis AM, Izquierdo JM, Ostronoff LK, Salinas M, Santaren JF, Cuezva JM** (1993). Translational regulation of mitochondrial differentiation in neonatal rat liver. Specific increase in the translational efficiency of the nuclear-encoded mitochondrial beta-F1-ATPase mRNA. *J Biol Chem* 268: 1868-75.
- Lunde BM, Moore C, Varani G** (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 479-90.
- Lypowy J, Chen IY, Abdellatif M** (2005). An alliance between Ras GTPase-activating protein, filamin C, and Ras GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein regulates myocyte growth. *J Biol Chem* 280: 25717-28.
- Ma WJ, Cheng S, Campbell C, Wright A, Furneaux H** (1996). Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *J Biol Chem* 271: 8144-51.
- Mai RT, Yeh TS, Kao CF, Sun SK, Huang HH, Wu Lee YH** (2006). Hepatitis C virus core protein recruits nucleolar phosphoprotein B23 and coactivator p300 to relieve the repression effect of transcriptional factor YY1 on B23 gene expression. *Oncogene* 25: 448-62.
- Mankoff DA, Eary JF, Link JM, Muzi M, Rajendran JG, Spence AM, Krohn KA** (2007). Tumor-specific positron emission tomography imaging in patients: [18F] fluorodeoxyglucose and beyond. *Clin Cancer Res* 13: 3460-9.
- Martinez-Diez M, Santamaria G, Ortega AD, Cuezva JM** (2006). Biogenesis and Dynamics of Mitochondria during the Cell Cycle: Significance of 3'UTRs. *PLoS ONE* 1: e107.
- Mathupala SP, Heese C, Pedersen PL** (1997). Glucose catabolism in cancer cells. The type II hexokinase promoter contains functionally active response elements for the tumor suppressor p53. *J Biol Chem* 272: 22776-80.
- Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM** (2006). p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312: 1650-3.
- Matsuyama S, Xu Q, Velours J, Reed JC** (1998). The Mitochondrial F0F1-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol Cell* 1: 327-36.
- Mayer D, Molawi K, Martinez-Sobrido L, Ghanem A, Thomas S, Baginsky S, Grossmann J, Garcia-Sastre A, Schwemmle M** (2007). Identification of cellular interaction partners of the influenza virus ribonucleoprotein complex and polymerase complex using proteomic-based approaches. *J Proteome Res* 6: 672-82.
- Mayor F, Cuezva JM** (1985). Hormonal and metabolic changes in the perinatal period. *Biol Neonate* 48: 185-96.

- Meng Z, King PH, Nabors LB, Jackson NL, Chen CY, Emanuel PD, Blume SW** (2005). The ELAV RNA-stability factor HuR binds the 5'-untranslated region of the human IGF-IR transcript and differentially represses cap-dependent and IRES-mediated translation. *Nucleic Acids Res* 33: 2962-79.
- Merrill MK, Gromeier M** (2006). The double-stranded RNA binding protein 76:NF45 heterodimer inhibits translation initiation at the rhinovirus type 2 internal ribosome entry site. *J Virol* 80: 6936-42.
- Millet O, Hudson RP, Kay LE** (2003). The energetic cost of domain reorientation in maltose-binding protein as studied by NMR and fluorescence spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12700-5.
- Miyazaki Y, Takamatsu T, Nosaka T, Fujita S, Martin TE, Hatanaka M** (1995). The cytotoxicity of human immunodeficiency virus type 1 Rev: implications for its interaction with the nucleolar protein B23. *Exp Cell Res* 219: 93-101.
- Moore MJ** (2005). From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 309: 1514-8.
- Mootha VK, Bunkenborg J, Olsen JV, Hjerrild M, Wisniewski JR, Stahl E, Bolouri MS, Ray HN, Sihag S, Kamal M, Patterson N, Lander ES, Mann M** (2003). Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* 115: 629-40.
- Mrena J, Wiksten JP, Thiel A, Kokkola A, Pohjola L, Lundin J, Nordling S, Ristimäki A, Haglund C** (2005). Cyclooxygenase-2 is an independent prognostic factor in gastric cancer and its expression is regulated by the messenger RNA stability factor HuR. *Clin Cancer Res* 11: 7362-8.
- Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, Lee CG, Hurwitz J, Parvin JD, Montminy M** (1997). RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell* 90: 1107-12.
- Nielsen FC, Nielsen J, Kristensen MA, Koch G, Christiansen J** (2002). Cytoplasmic trafficking of IGF-II mRNA-binding protein by conserved KH domains. *J Cell Sci* 115: 2087-97.
- Nielsen J, Adolph SK, Rajpert-De Meyts E, Lykke-Andersen J, Koch G, Christiansen J, Nielsen FC** (2003). Nuclear transit of human zipcode-binding protein IMP1. *Biochem J* 376: 383-91.
- Nielsen J, Christiansen J, Lykke-Andersen J, Johnsen AH, Wewer UM, Nielsen FC** (1999). A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol Cell Biol* 19: 1262-70.
- Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M, Nagata K** (2001). Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett* 506: 272-6.

- Oleynikov Y, Singer RH** (2003). Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr Biol* 13: 199-207.
- OrtegaAD, Cuezva JM** (2004). The organelles I: Mitochondrial failure and neurodegeneration. en *Brain damage and repair*. (Ed. Herdegen T and Delgado-García JM). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 95-109.
- Ortega AD, Cuezva JM** (2005). Mitochondria in cancer biology. en *New frontiers in mitochondrial biogenesis and disease*. (Ed. Villarroja F). Research Signpost, Kerala, India. pp. 111-139.
- Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Cans C, Neubauer G, Bomsztyk K, Superti-Furga G, Hentze MW** (2002). c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *Mol Cell Biol* 22: 4535-43.
- Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA, Dang CV** (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* 275: 21797-800.
- Ostronoff LK, Izquierdo JM, Cuezva JM** (1995). mt-mRNA stability regulates the expression of the mitochondrial genome during liver development. *Biochem Biophys Res Commun* 217: 1094-8.
- Ostronoff LK, Izquierdo JM, Enriquez JA, Montoya J, Cuezva JM** (1996). Transient activation of mitochondrial translation regulates the expression of the mitochondrial genome during mammalian mitochondrial differentiation. *Biochem J* 316 (Pt 1): 183-91.
- Palaniswamy V, Moraes KC, Wilusz CJ, Wilusz J** (2006). Nucleophosmin is selectively deposited on mRNA during polyadenylation. *Nat Struct Mol Biol* 13: 429-35.
- Pan F, Huttelmaier S, Singer RH, Gu W** (2007). ZBP2 facilitates binding of ZBP1 to beta-actin mRNA during transcription. *Mol Cell Biol* 27: 8340-51.
- Parker F, Maurier F, Delumeau I, Duchesne M, Faucher D, Debussche L, Dugue A, Schweighoffer F, Tocque B** (1996). A Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein. *Mol Cell Biol* 16: 2561-9.
- Parker LM, Fierro-Monti I, Mathews MB** (2001). Nuclear factor 90 is a substrate and regulator of the eukaryotic initiation factor 2 kinase double-stranded RNA-activated protein kinase. *J Biol Chem* 276: 32522-30.
- Parlo RA, Coleman PS** (1984). Enhanced rate of citrate export from cholesterol-rich hepatoma mitochondria. The truncated Krebs cycle and other metabolic ramifications of mitochondrial membrane cholesterol. *J Biol Chem* 259: 9997-10003.
- Parrella P, Xiao Y, Fliss M, Sanchez-Cespedes M, Mazzarelli P, Rinaldi M, Nicol T, Gabrielson E, Cuomo C, Cohen D, Pandit S, Spencer M, Rabitti C, Fazio VM, Sidransky D** (2001). Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates. *Cancer Res* 61: 7623-6.

- Parrott AM, Walsh MR, Reichman TW, Mathews MB** (2005). RNA binding and phosphorylation determine the intracellular distribution of nuclear factors 90 and 110. *J Mol Biol* 348: 281-93.
- Paumard P, Vaillier J, Coulary B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brethes D, di Rago JP, Velours J** (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J* 21: 221-30.
- Peabody DS, Ely KR** (1992). Control of translational repression by protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res* 20: 1649-55.
- Pedersen PL** (1978). Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog Exp Tumor Res* 22: 190-274.
- Pelicano H, Xu RH, Du M, Feng L, Sasaki R, Carew JS, Hu Y, Ramdas L, Hu L, Keating MJ, Zhang W, Plunkett W, Huang P** (2006). Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism. *J Cell Biol* 175: 913-23.
- Peng R, Dye BT, Perez I, Barnard DC, Thompson AB, Patton JG** (2002). PSF and p54nrb bind a conserved stem in U5 snRNA. *Rna* 8: 1334-47.
- Plas DR, Thompson CB** (2005). Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* 24: 7435-42.
- Pryor KD, Leiting B** (1997). High-level expression of soluble protein in Escherichia coli using a His6-tag and maltose-binding-protein double-affinity fusion system. *Protein Expr Purif* 10: 309-19.
- Pullmann R, Jr., Kim HH, Abdelmohsen K, Lal A, Martindale JL, Yang X, Gorospe M** (2007). Analysis of turnover and translation regulatory RNA-binding protein expression through binding to cognate mRNAs. *Mol Cell Biol* 27: 6265-78.
- Ramos-Montoya A, Lee WN, Bassilian S, Lim S, Trebukhina RV, Kazhyna MV, Ciudad CJ, Noe V, Centelles JJ, Cascante M** (2006). Pentose phosphate cycle oxidative and nonoxidative balance: A new vulnerable target for overcoming drug resistance in cancer. *Int J Cancer* 119: 2733-41.
- Rathmell JC, Fox CJ, Plas DR, Hammerman PS, Cinalli RM, Thompson CB** (2003). Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol Cell Biol* 23: 7315-28.
- Reddy TR, Tang H, Xu W, Wong-Staal F** (2000). Sam68, RNA helicase A and Tap cooperate in the post-transcriptional regulation of human immunodeficiency virus and type D retroviral mRNA. *Oncogene* 19: 3570-5.
- Reichman TW, Muniz LC, Mathews MB** (2002). The RNA binding protein nuclear factor 90 functions as both a positive and negative regulator of gene expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 22: 343-56.

- Reifschneider NH, Goto S, Nakamoto H, Takahashi R, Sugawa M, Dencher NA, Krause F** (2006). Defining the mitochondrial proteomes from five rat organs in a physiologically significant context using 2D blue-native/SDS-PAGE. *J Proteome Res* 5: 1117-32.
- Reinke H, Gatfield D** (2006). Genome-wide oscillation of transcription in yeast. *Trends Biochem Sci* 31: 189-91.
- Reyes R, Izquierdo JM** (2007). The RNA-binding protein PTB exerts translational control on 3'-untranslated region of the mRNA for the ATP synthase beta-subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 357: 1107-12.
- Rhodes DR, Kalyana-Sundaram S, Mahavisno V, Varambally R, Yu J, Briggs BB, Barrette TR, Anstet MJ, Kincaid-Beal C, Kulkarni P, Varambally S, Ghosh D, Chinnaiyan AM** (2007). Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia* 9: 166-80.
- Ricart J, Egea G, Izquierdo JM, San Martin C, Cuezva JM** (1997). Subcellular structure containing mRNA for beta subunit of mitochondrial H⁺-ATP synthase in rat hepatocytes is translationally active. *Biochem J* 324 (Pt 2): 635-43.
- Ricart J, Izquierdo JM, Di Liegro CM, Cuezva JM** (2002). Assembly of the ribonucleoprotein complex containing the mRNA of the beta-subunit of the mitochondrial H⁺-ATP synthase requires the participation of two distal cis-acting elements and a complex set of cellular trans-acting proteins. *Biochem J* 365: 417-28.
- Rickards B, Flint SJ, Cole MD, LeRoy G** (2007). Nucleolin is required for RNA polymerase I transcription in vivo. *Mol Cell Biol* 27: 937-48.
- Rigo P, Paulus P, Kaschten BJ, Hustinx R, Bury T, Jerusalem G, Benoit T, Foidart-Willems J** (1996). Oncological applications of positron emission tomography with fluorine-18 fluorodeoxyglucose. *Eur J Nucl Med* 23: 1641-74.
- Robey IF, Lien AD, Welsh SJ, Baggett BK, Gillies RJ** (2005). Hypoxia-inducible factor-1alpha and the glycolytic phenotype in tumors. *Neoplasia* 7: 324-30.
- Rojo G, Chamorro M, Salas ML, Vinuela E, Cuezva JM, Salas J** (1998). Migration of mitochondria to viral assembly sites in African swine fever virus-infected cells. *J. Virol.* 72: 7583-7588.
- Rook MS, Lu M, Kosik KS** (2000). CaMKIIalpha 3' untranslated region-directed mRNA translocation in living neurons: visualization by GFP linkage. *J Neurosci* 20: 6385-93.
- Rosonina E, Ip JY, Calarco JA, Bakowski MA, Emili A, McCracken S, Tucker P, Ingles CJ, Blencowe BJ** (2005). Role for PSF in mediating transcriptional activator-dependent stimulation of pre-mRNA processing in vivo. *Mol Cell Biol* 25: 6734-46.

- Ross AF, Oleynikov Y, Kislauskis EH, Taneja KL, Singer RH** (1997). Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol* 17: 2158-65.
- Ross J, Lemm I, Berberet B** (2001). Overexpression of an mRNA-binding protein in human colorectal cancer. *Oncogene* 20: 6544-50.
- Rouslin W, Broge CW** (1993). Mechanisms of ATP conservation during ischemia in slow and fast heart rate hearts. *Am J Physiol* 264: C209-16.
- Roy BB, Hu J, Guo X, Russell RS, Guo F, Kleiman L, Liang C** (2006). Association of RNA helicase a with human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Biol Chem* 281: 12625-35.
- Sakamaki T, Casimiro MC, Ju X, Quong AA, Katiyar S, Liu M, Jiao X, Li A, Zhang X, Lu Y, Wang C, Byers S, Nicholson R, Link T, Shemluck M, Yang J, Fricke ST, Novikoff PM, Papanikolaou A, Arnold A, Albanese C, Pestell R** (2006). Cyclin D1 determines mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biol* 26: 5449-69.
- Samad MA, Okuwaki M, Haruki H, Nagata K** (2007). Physical and functional interaction between a nucleolar protein nucleophosmin/B23 and adenovirus basic core proteins. *FEBS Lett* 581: 3283-8.
- Sambrook J, Russell DW** (2001). Molecular cloning. A Laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Cespedes M** (2003). Dissecting the genetic alterations involved in lung carcinogenesis. *Lung Cancer* 40: 111-21.
- Santamaria G, Martinez-Diez M, Fabregat I, Cuezva JM** (2006). Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Carcinogenesis* 27: 925-35.
- Sasaki R, Komaki R, Macapinlac H, Erasmus J, Allen P, Forster K, Putnam JB, Herbst RS, Moran CA, Podoloff DA, Roth JA, Cox JD** (2005). [18F]fluorodeoxyglucose uptake by positron emission tomography predicts outcome of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23: 1136-43.
- Satrústegui J, Pardo B, Del Arco A** (2007). Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiol Rev* 87: 29-67.
- Sauer LA, Stayman JW, 3rd, Dauchy RT** (1982). Amino acid, glucose, and lactic acid utilization in vivo by rat tumors. *Cancer Res* 42: 4090-7.
- Savkur RS, Olson MO** (1998). Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* 26: 4508-15.

- Schneider R, Agol VI, Andino R, Bayard F, Cavener DR, Chappell SA, Chen JJ, Darlix JL, Dasgupta A, Donze O, Duncan R, Elroy-Stein O, Farabaugh PJ, Filipowicz W, Gale M, Jr., Gehrke L, Goldman E, Groner Y, Harford JB, Hatzoglou M, He B, Hellen CU, Hentze MW, Hershey J, Hershey P, Hohn T, Holcik M, Hunter CP, Igarashi K, Jackson R, Jagus R, Jefferson LS, Joshi B, Kaempfer R, Katze M, Kaufman RJ, Kiledjian M, Kimball SR, Kimchi A, Kirkegaard K, Koromilas AE, Krug RM, Kruijs V, Lamphear BJ, Lemon S, Lloyd RE, Maquat LE, Martinez-Salas E, Mathews MB, Mauro VP, Miyamoto S, Mohr I, Morris DR, Moss EG, Nakashima N, Palmenberg A, Parkin NT, Pe'ery T, Pelletier J, Peltz S, Pestova TV, Pilipenko EV, Prats AC, Racaniello V, Read GS, Rhoads RE, Richter JD, Rivera-Pomar R, Rouault T, Sachs A, Sarnow P, Scheper GC, Schiff L, Schoenberg DR, Semler BL, Siddiqui A, Skern T, Sonenberg N, Tahara SM, Thomas AA, Toulme JJ, Wilusz J, Wimmer E, Witherell G, Wormington M (2001). New ways of initiating translation in eukaryotes. *Mol Cell Biol* 21: 8238-46.
- Schulz TJ, Thierbach R, Voigt A, Drewes G, Mietzner B, Steinberg P, Pfeiffer AF, Ristow M (2006). Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. *J Biol Chem* 281: 977-81.
- Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 269: 23757-63.
- Shav-Tal Y, Zipori D (2002). PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett* 531: 109-14.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68: 850-8.
- Shi H, Huang Y, Zhou H, Song X, Yuan S, Fu Y, Luo Y (2007). Nucleolin is a receptor that mediates antiangiogenic and antitumor activity of endostatin. *Blood* 110: 2899-906.
- Shi L, Zhao G, Qiu D, Godfrey WR, Vogel H, Rando TA, Hu H, Kao PN (2005). NF90 regulates cell cycle exit and terminal myogenic differentiation by direct binding to the 3'-untranslated region of MyoD and p21WAF1/CIP1 mRNAs. *J Biol Chem* 280: 18981-9.
- Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6658-63.
- Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark G, Edge SB, Hayes DF, Hughes LL, Hutter RV, Morrow M, Page DL, Recht A, Theriault RL, Thor A, Weaver DL, Wieand HS, Greene FL (2002). Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 20: 3628-36.

- Smith TA, Sharma RI, Thompson AM, Paulin FE** (2006). Tumor 18F-FDG incorporation is enhanced by attenuation of P53 function in breast cancer cells in vitro. *J Nucl Med* 47: 1525-30.
- Soret M, Bacharach SL, Buvat I** (2007). Partial-volume effect in PET tumor imaging. *J Nucl Med* 48: 932-45.
- Sparanese D, Lee CH** (2007). CRD-BP shields c-myc and MDR-1 RNA from endonucleolytic attack by a mammalian endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* 35: 1209-21.
- Spurlino JC, Lu GY, Quioco FA** (1991). The 2.3-A resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. *J Biol Chem* 266: 5202-19.
- Steinberg P, Storkel S, Oesch F, Thoenes W** (1992). Carbohydrate metabolism in human renal clear cell carcinomas. *Lab Invest* 67: 506-11.
- Stohr N, Lederer M, Reinke C, Meyer S, Hatzfeld M, Singer RH, Huttelmaier S** (2006). ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *J Cell Biol* 175: 527-34.
- Studier FW** (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41: 207-34.
- Swaminathan V, Kishore AH, Febitha KK, Kundu TK** (2005). Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Mol Cell Biol* 25: 7534-45.
- Tan DJ, Bai RK, Wong LJ** (2002). Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. *Cancer Res* 62: 972-6.
- Tang H, McDonald D, Middlesworth T, Hope TJ, Wong-Staal F** (1999). The carboxyl terminus of RNA helicase A contains a bidirectional nuclear transport domain. *Mol Cell Biol* 19: 3540-50.
- Tang H, Wong-Staal F** (2000). Specific interaction between RNA helicase A and Tap, two cellular proteins that bind to the constitutive transport element of type D retrovirus. *J Biol Chem* 275: 32694-700.
- Tang HL, Lung HL, Wu KC, Le AH, Tang HM, Fung MC** (2007). Vimentin supports mitochondrial morphology and organisation. *Biochem J*.
- Terpe K** (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 523-33.
- Tessier CR, Doyle GA, Clark BA, Pitot HC, Ross J** (2004). Mammary tumor induction in transgenic mice expressing an RNA-binding protein. *Cancer Res* 64: 209-14.

- Thierbach R, Schulz TJ, Isken F, Voigt A, Mietzner B, Drewes G, von Kleist-Retzow JC, Wiesner RJ, Magnuson MA, Puccio H, Pfeiffer AF, Steinberg P, Ristow M** (2005). Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum Mol Genet* 14: 3857-64.
- Tian B, Bevilacqua PC, Diegelman-Parente A, Mathews MB** (2004). The double-stranded-RNA-binding motif: interference and much more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 1013-23.
- Toivola DM, Tao GZ, Habtezion A, Liao J, Omary MB** (2005). Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol* 15: 608-17.
- Tolstonog GV, Belichenko-Weitzmann IV, Lu JP, Hartig R, Shoeman RL, Traub U, Traub P** (2005). Spontaneously immortalized mouse embryo fibroblasts: growth behavior of wild-type and vimentin-deficient cells in relation to mitochondrial structure and activity. *DNA Cell Biol* 24: 680-709.
- Tomiyaama A, Serizawa S, Tachibana K, Sakurada K, Samejima H, Kuchino Y, Kitanaka C** (2006). Critical role for mitochondrial oxidative phosphorylation in the activation of tumor suppressors Bax and Bak. *J Natl Cancer Inst* 98: 1462-73.
- Tourriere H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, Bertrand E, Tazi J** (2003). The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol* 160: 823-31.
- Tourriere H, Gallouzi IE, Chebli K, Capony JP, Mouaikel J, van der Geer P, Tazi J** (2001). RasGAP-associated endoribonuclease G3BP: selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization. *Mol Cell Biol* 21: 7747-60.
- Traub P, Bauer C, Hartig R, Grub S, Stahl J** (1998). Colocalization of single ribosomes with intermediate filaments in puromycin-treated and serum-starved mouse embryo fibroblasts. *Biol Cell* 90: 319-37.
- Tu BP, Kudlicki A, Rowicka M, McKnight SL** (2005). Logic of the yeast metabolic cycle: temporal compartmentalization of cellular processes. *Science* 310: 1152-8.
- Tu BP, Mohler RE, Liu JC, Dombek KM, Young ET, Synovec RE, McKnight SL** (2007). Cyclic changes in metabolic state during the life of a yeast cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 16886-91.
- Valcarce C, Navarrete RM, Encabo P, Loeches E, Satrustegui J, Cuezva JM** (1988). Postnatal development of rat liver mitochondrial functions. The roles of protein synthesis and of adenine nucleotides. *J Biol Chem* 263: 7767-75.
- Valcarce C, Vitorica J, Satrustegui J, Cuezva JM** (1990). Rapid postnatal developmental changes in the passive proton permeability of the inner membrane in rat liver mitochondria. *J Biochem* 108: 642-5.

- van der Giessen K, Di-Marco S, Clair E, Gallouzi IE** (2003). RNAi-mediated HuR depletion leads to the inhibition of muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 278: 47119-28.
- van Venrooij WJ, Sillekens PT, van Eekelen CA, Reinders RJ** (1981). On the association of mRNA with the cytoskeleton in uninfected and adenovirus-infected human KB cells. *Exp Cell Res* 135: 79-91.
- Vansteenkiste J, Fischer BM, Doms C, Mortensen J** (2004). Positron-emission tomography in prognostic and therapeutic assessment of lung cancer: systematic review. *Lancet Oncol* 5: 531-40.
- Villace P, Marion RM, Ortin J** (2004). The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 32: 2411-20.
- Wang C, Li Z, Lu Y, Du R, Katiyar S, Yang J, Fu M, Leader JE, Quong A, Novikoff PM, Pestell RG** (2006). Cyclin D1 repression of nuclear respiratory factor 1 integrates nuclear DNA synthesis and mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11567-72.
- Wang T, Marquardt C, Foker J** (1976). Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation. *Nature* 261: 702-5.
- Wang W, Caldwell MC, Lin S, Furneaux H, Gorospe M** (2000). HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *EMBO J* 19: 2340-50.
- Wang W, Fan J, Yang X, Furer-Galban S, Lopez de Silanes I, von Kobbe C, Guo J, Georas SN, Foufelle F, Hardie DG, Carling D, Gorospe M** (2002). AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR. *Mol Cell Biol* 22: 3425-36.
- Wang W, Furneaux H, Cheng H, Caldwell MC, Hutter D, Liu Y, Holbrook N, Gorospe M** (2000). HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Mol Cell Biol* 20: 760-9.
- Wang W, Goswami S, Lapidus K, Wells AL, Wyckoff JB, Sahai E, Singer RH, Segall JE, Condeelis JS** (2004). Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. *Cancer Res* 64: 8585-94.
- Wang W, Martindale JL, Yang X, Chrest FJ, Gorospe M** (2005). Increased stability of the p16 mRNA with replicative senescence. *EMBO Rep* 6: 158-64.
- Wang W, Yang X, Kawai T, Lopez de Silanes I, Mazan-Mamczarz K, Chen P, Chook YM, Quensel C, Kohler M, Gorospe M** (2004). AMP-activated protein kinase-regulated phosphorylation and acetylation of importin alpha1: involvement in the nuclear import of RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 279: 48376-88.

- Wang X** (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15: 2922-33.
- Warburg O** (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124: 269-70.
- Warburg O** (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309-14.
- Weekes J, Wheeler CH, Yan JX, Weil J, Eschenhagen T, Scholtysik G, Dunn MJ** (1999). Bovine dilated cardiomyopathy: proteomic analysis of an animal model of human dilated cardiomyopathy. *Electrophoresis* 20: 898-906.
- White JP, Cardenas AM, Marissen WE, Lloyd RE** (2007). Inhibition of cytoplasmic mRNA stress granule formation by a viral proteinase. *Cell Host Microbe* 2: 295-305.
- Yanagida M, Shimamoto A, Nishikawa K, Furuichi Y, Isobe T, Takahashi N** (2001). Isolation and proteomic characterization of the major proteins of the nucleolin-binding ribonucleoprotein complexes. *Proteomics* 1: 1390-404.
- Yi Z, Fang C, Pan T, Wang J, Yang P, Yuan Z** (2006). Subproteomic study of hepatitis C virus replicon reveals Ras-GTPase-activating protein binding protein 1 as potential HCV RC component. *Biochem Biophys Res Commun* 350: 174-8.
- Zekri L, Chebli K, Tourriere H, Nielsen FC, Hansen TV, Rami A, Tazi J** (2005). Control of fetal growth and neonatal survival by the RasGAP-associated endoribonuclease G3BP. *Mol Cell Biol* 25: 8703-16.
- Zhang JY, Chan EK, Peng XX, Tan EM** (1999). A novel cytoplasmic protein with RNA-binding motifs is an autoantigen in human hepatocellular carcinoma. *J Exp Med* 189: 1101-10.
- Zhang S, Grosse F** (1997). Domain structure of human nuclear DNA helicase II (RNA helicase A). *J Biol Chem* 272: 11487-94.
- Zhang S, Herrmann C, Grosse F** (1999). Nucleolar localization of murine nuclear DNA helicase II (RNA helicase A). *J Cell Sci* 112 (Pt 16): 2693-703.
- Zhang Z, Carmichael GG** (2001). The fate of dsRNA in the nucleus: a p54(nrb)-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs. *Cell* 106: 465-75.
- Zhou S, Kachhap S, Singh KK** (2003). Mitochondrial impairment in p53-deficient human cancer cells. *Mutagenesis* 18: 287-92.
- Zhou Z, Licklider LJ, Gygi SP, Reed R** (2002). Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* 419: 182-5.

ANEXO I

Características	No.	%
Edad, años		
Rango	43-82	
Media	65	
Sexo		
Hombre	104	96
Mujer	6	4
Histología		
Escamoso	63	57
Adenocarcinoma	26	24
Otros	21	19
Estadio T		
T1	25	23
T2	65	59
T3	12	11
T4	8	7
Estadio N		
N0	65	59
N1	17	15
N2	23	21
N3	5	5
Estadio M		
M0	93	85
M1	17	15
SUV _{máx}		
0-5	40	36
6-10	51	47
> 10	17	15
Desconocida	2	2

Tabla A1: Resumen de las características clínico-patológicas de la cohorte de pacientes estudiados.

Característica	Nº	%	HuR
Edad, años			
<50	30	34	1,12 ± 0,17
>50	59	66	1,17 ± 0,11
Histología			
D	73	82	1,23 ± 0,10
L	10	11	0,77 ± 0,13
Otros	6	7	0,85 ± 0,47
Nódulos, nº			
0	46	52	1,14 ± 0,13
1-3	27	30	1,07 ± 0,16
>3	16	18	1,32 ± 0,23
Tamaño			
≤ 20 mm	31	35	1,10 ± 0,13
> 20 mm	58	65	1,18 ± 0,12
Estadio			
I	18	20	1,22 ± 0,19
II	52	58	1,09 ± 0,12
III	19	21	1,27 ± 0,20
Grado			
1	9	10	0,89 ± 0,22
2	24	27	1,24 ± 0,20
3	41	46	1,28 ± 0,14

Tabla A2: Resumen de las características clínico-patológicas y de la expresión de HuR de la cohorte de pacientes de adenocarcinoma de mama estudiados. Los datos de expresión de HuR que se muestran para cada sub-grupo de pacientes estratificados según las características clínico-patológicas representan la media ± S.E.M.

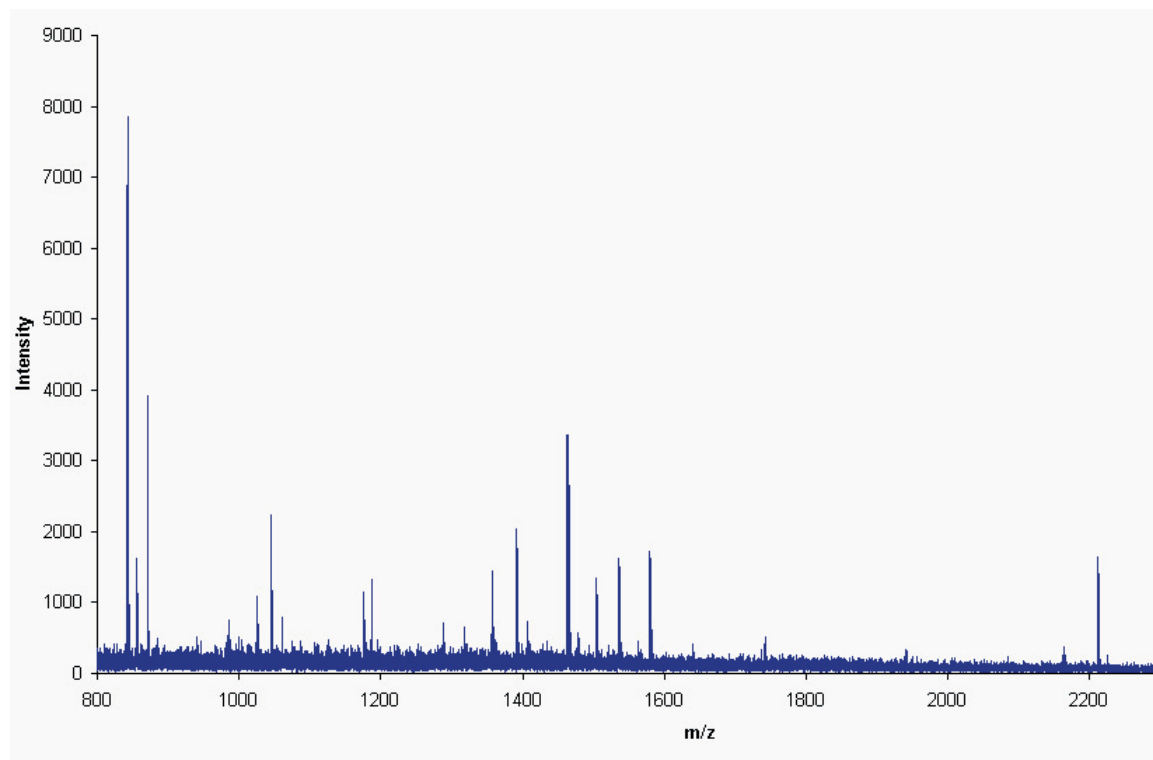
Parámetro	Categorías	N	%	Eventos	SLE 5 años. (prop)	SEM	95% IC		P
Nódulos	0	50	50	8	0.85	0.05	0.74	0.95	0.001
	1 to 3	32	32	12	0.65	0.09	0.48	0.82	
	>3	19	19	11	0.51	0.12	0.28	0.74	
Estadio	I	21	21	2	0.95	0.05	0.85	1.05	0.001
	II	57	56	16	0.72	0.06	0.60	0.84	
	III	23	23	13	0.51	0.11	0.31	0.72	
Grado	1	9	10	2	0.89	0.10	0.68	1.09	0.041
	2	29	34	5	0.86	0.07	0.72	0.99	
	3	48	56	20	0.62	0.07	0.47	0.76	
GAPDH	L	72	71	18	0.77	0.05	0.67	0.87	0.056
	H	29	29	13	0.62	0.09	0.44	0.80	
β cluster	C1	81	83	21	0.77	0.05	0.67	0.86	0.003
	C2	17	17	10	0.46	0.12	0.22	0.70	
HuR	L	37	42	14	0.65	0.08	0.49	0.81	0.053

Tabla A3: Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad (SLE) de la cohorte de pacientes. Se ha realizado el análisis de la SLE de Kaplan-Meier de todos los pacientes y se ha comparado la SLE de los pacientes estratificados mediante los parámetros clínico-patológicos (Nódulos, Estadio, Grado) y bioenergéticos (GAPDH, β cluster y HuR) usando el estadístico Log Rango (se muestra el P valor). Se muestra la proporción acumulada de pacientes que a los 5 años no han desarrollado metástasis (SLE 5 años (prop)) con su error típico (SEM) y el intervalo de confianza (95% IC).

Material suplementario A1: Resultados de la identificación proteómica de las β -mRNABPs por MALDI-TOF y MS/MS.

Se muestran el espectro MALDI-TOF (huella peptídica), el espectro MS/MS de un péptido (en algunos casos) y los resultados de la búsqueda en la base de datos mediante el motor de MASCOT search (*Matrix science*).

1. DHX9

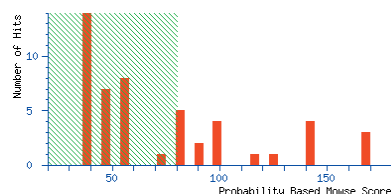


Mascot Search Results

User : emi
Email : proteomics.maldi@cnic.es
Search title :
Database : NCBI nr 20080229 (6251073 sequences; 2135462495 residues)
Timestamp : 6 Mar 2008 at 11:37:44 GMT
Top Score : 168 for [gi|71153339](#), ATP-dependent RNA helicase A (Nuclear DNA helicase II) (NDH II) (DEAH box protein 9)

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 80 are significant ($p < 0.05$).



Protein Summary Report

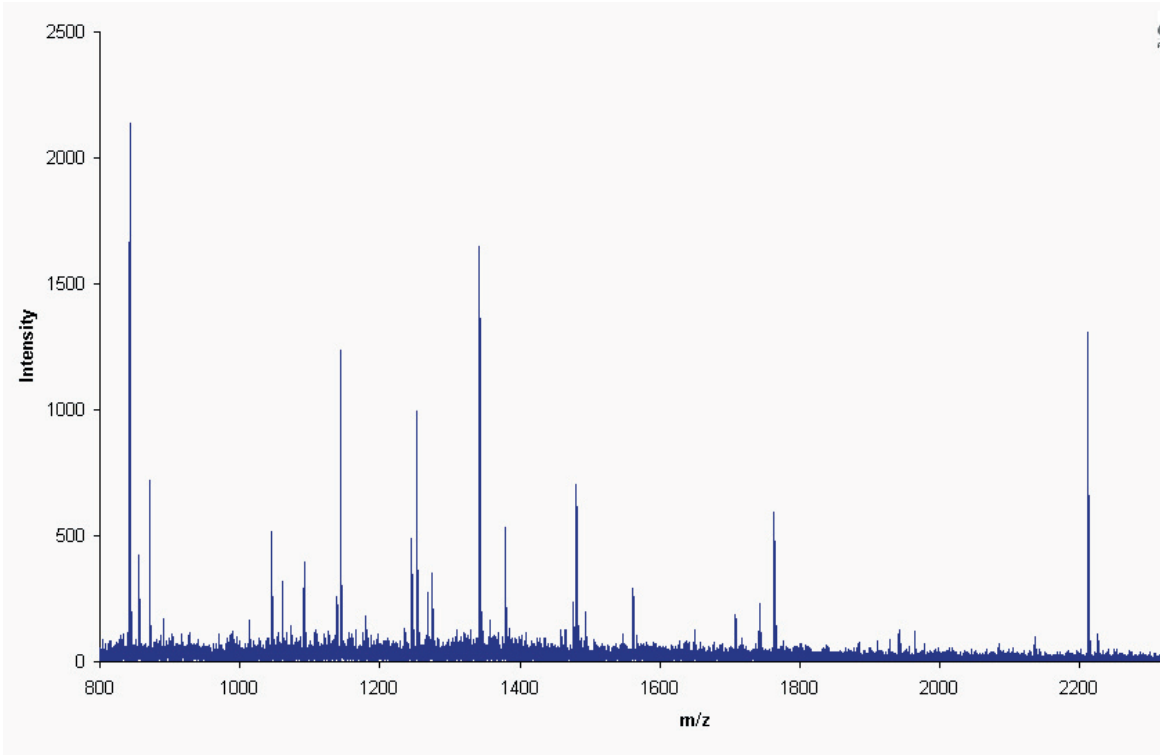
Format As [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits 5

Index

Accession	Mass	Score	Description
1. gi 71153339	142140	168	ATP-dependent RNA helicase A (Nuclear DNA helicase II) (NDH II) (DEAH box protein 9)
2. gi 100913206	142181	168	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9 [Homo sapiens]
3. gi 109019116	142538	168	PREDICTED: DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9 isoform 1 [Macaca mulatta]
4. gi 1806048	142100	144	nuclear DNA helicase II [Homo sapiens]
5. gi 1082769	143409	143	RNA helicase A - human

2. SFPQ

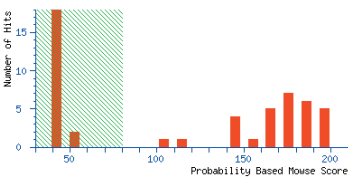


Mascot Search Results

User : emi
Email : proteomics.maldi@cnic.es
Search title :
MS data file : DATA.TXT
Database : NCBI nr 20080229 (6251073 sequences; 2135462495 residues)
Timestamp : 6 Mar 2008 at 11:09:41 GMT
Warning : A Peptide summary report will usually give a much clearer picture of MS/MS search results.
Top Score : 196 for gi|109477262, PREDICTED: similar to NonO/p54nrb homolog [Rattus norvegicus]

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 80 are significant ($p < 0.05$).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

Format As

Protein Summary (deprecated)

Help

Significance threshold $p < 0.05$

Max. number of hits 5

Standard scoring ☒ MudPIT scoring ☐ Ions score or expect cut-off 0

Show sub-sets 0

Show pop-ups ☒ Suppress pop-ups ☐ Sort unassigned Decreasing Score

Require bold red ☐

Re-Search All

Search Unmatched

Index

Accession	Mass	Score	Description
1. gi 109477262	66065	196	PREDICTED: similar to NonO/p54nrb homolog [Rattus norvegicus]
2. gi 119627830	66351	196	splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated), isoform CRA_e
3. gi 138014635	68702	195	SFPQ protein [Homo sapiens]
4. gi 149252953	70172	194	PREDICTED: similar to PTB-associated splicing factor [Mus musculus]
5. gi 148698321	71978	193	mCG10912, isoform CRA_a [Mus musculus]

MASCOT Mascot Search Results

Peptide View

MS/MS Fragmentation of **FATHAAALSVR**

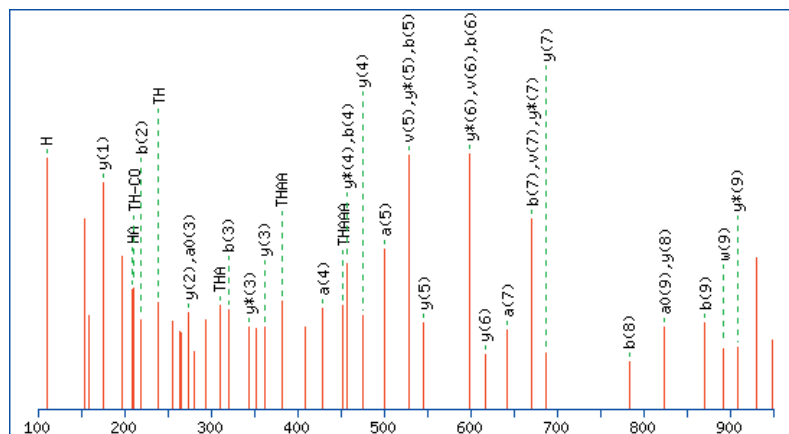
Found in **gi|38014635**, SFPQ protein [Homo sapiens]

Match to Query 2: 1142.615724 from(1143.623000,1+) intensity(0.0000)

From data file DATA.TXT

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, 100 to 950 Da



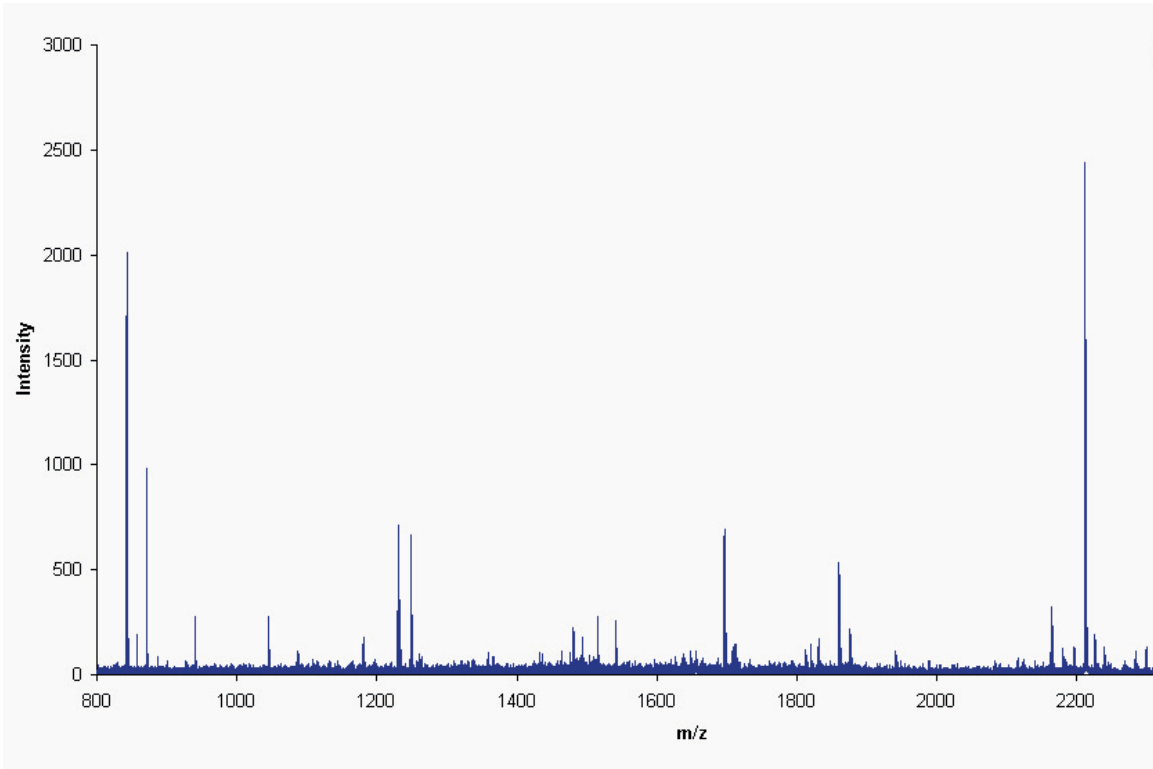
Monoisotopic mass of neutral peptide **Mr(calc)**: 1142.6196

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Ions Score: 78 Expect: 2.1e-05

Matches (**Bold Red**): 41/158 fragment ions using 34 most intense peaks

3. NonO

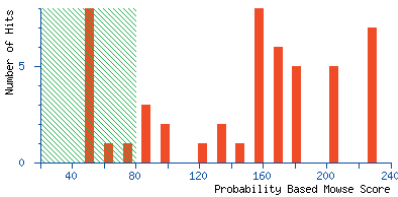


Mascot Search Results

User : emi
Email : proteomics.maldi@cnic.es
Search title :
Database : NCBI nr 20080229 (6251073 sequences; 2135462495 residues)
Timestamp : 6 Mar 2008 at 11:51:07 GMT
Top Score : 228 for [gi|74007642](#), PREDICTED: similar to non-POU domain containing, octamer-binding isoform 7 [Canis familiaris]

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 80 are significant ($p < 0.05$).



Protein Summary Report

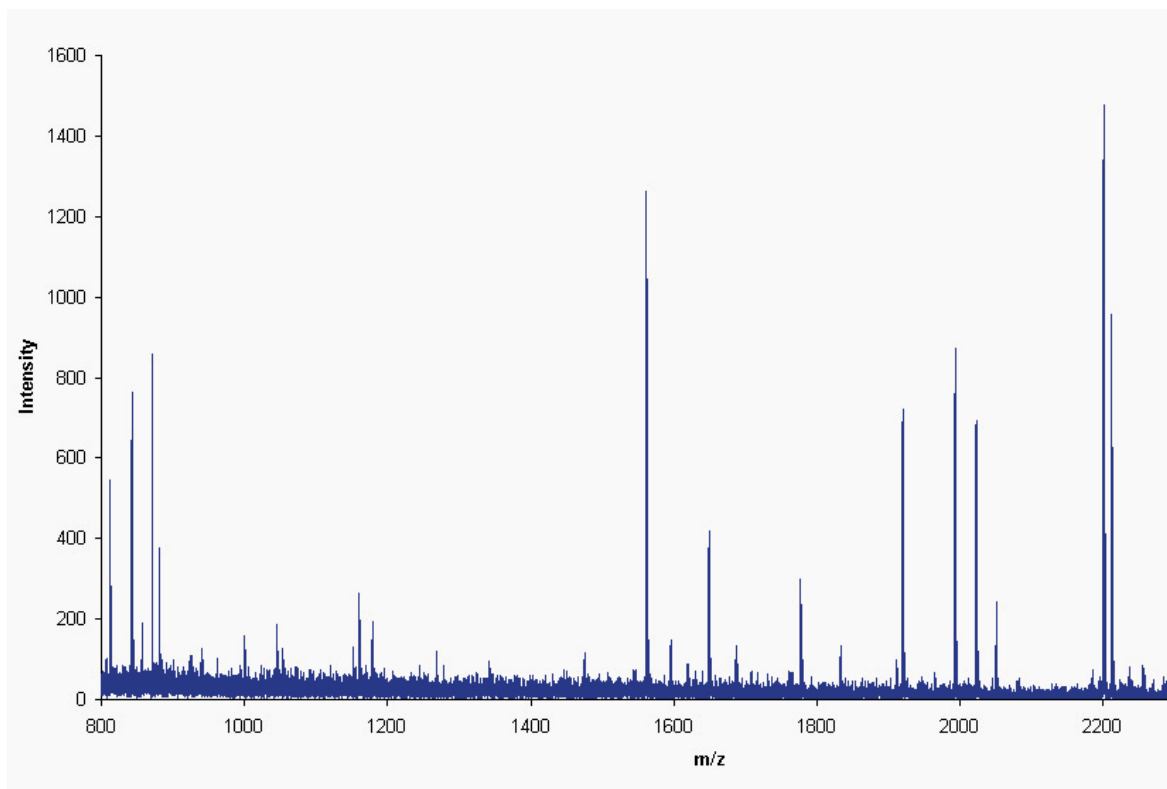
[Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits 5

Index

Accession	Mass	Score	Description
1. gi 74007642	55023	228	PREDICTED: similar to non-POU domain containing, octamer-binding isoform 7 [Canis familiaris]
2. gi 114689049	55117	228	PREDICTED: non-POU domain containing, octamer-binding isoform 9 [Pan troglodytes]
3. gi 34932414	54311	226	non-POU domain containing, octamer-binding [Homo sapiens]
4. gi 74007632	54183	226	PREDICTED: similar to non-POU domain containing, octamer-binding isoform 2 [Canis familiaris]
5. gi 114053303	54201	226	non-POU domain containing, octamer-binding [Bos taurus]

4. NUCLEOLINA

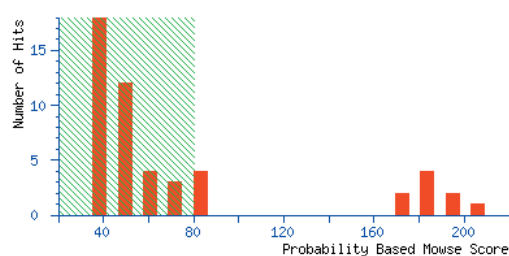


Mascot Search Results

User : emi
 Email : proteomics.maldi@cnic.es
 Search title :
 Database : NCBI nr 20080229 (6251073 sequences; 2135462495 residues)
 Timestamp : 6 Mar 2008 at 11:40:28 GMT
 Top Score : 206 for [gi|119591368](#), nucleolin, isoform CRA_c [Homo sapiens]

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 80 are significant ($p < 0.05$).



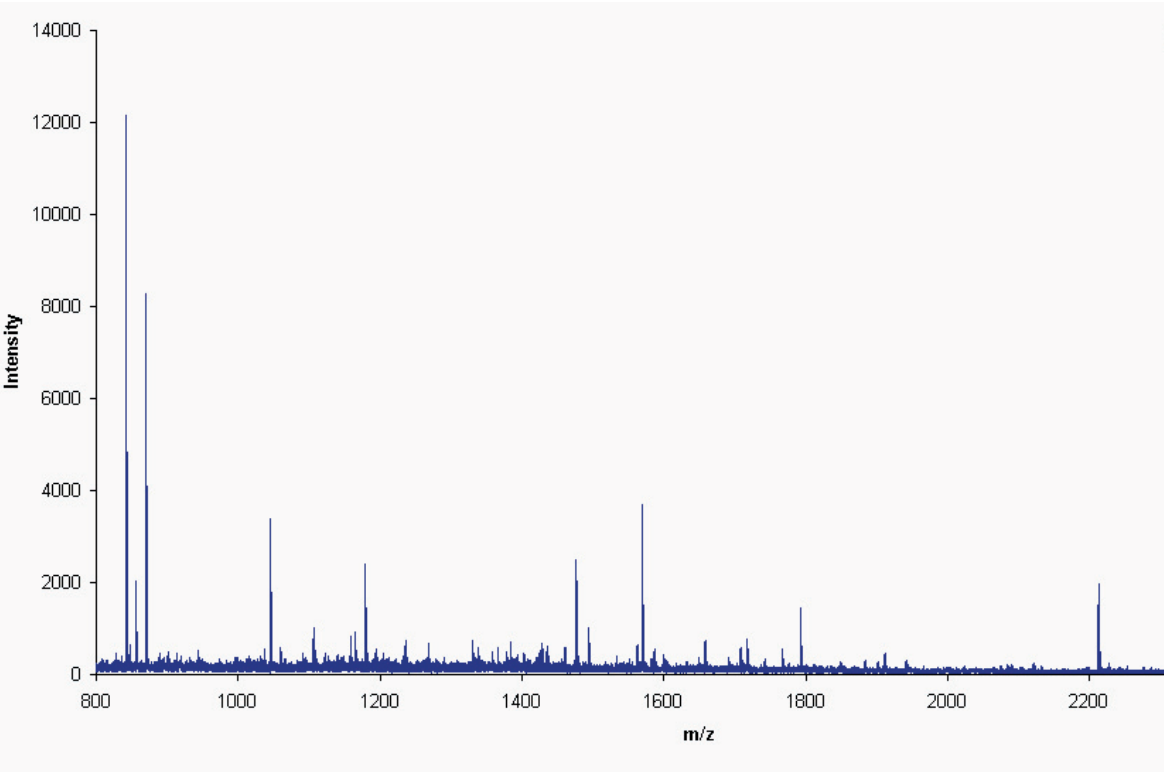
Protein Summary Report

Format As [Help](#)
 Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits 5

Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi 119591368	58576	206	nucleolin, isoform CRA_c [Homo sapiens]
2.	gi 34534595	65979	198	unnamed protein product [Homo sapiens]
3.	gi 21750187	74337	194	unnamed protein product [Homo sapiens]
4.	gi 189306	76355	189	nucleolin
5.	gi 55956788	76625	188	nucleolin [Homo sapiens]

5. NUCLEOFOSMINA

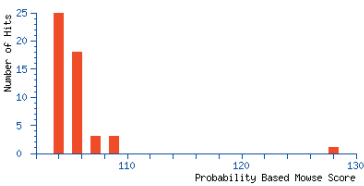


Mascot Search Results

User : emi
Email : proteomics.maldi@cnic.es
Search title :
MS data file : DATA.TXT
Database : NCBI nr 20080229 (6251073 sequences; 2135462495 residues)
Timestamp : 6 Mar 2008 at 11:27:17 GMT
Warning : A Peptide summary report will usually give a much clearer picture of MS/MS search results.
Top Score : 128 for gi|825671, B23 nucleophosmin (280 AA) [Homo sapiens]

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 80 are significant ($p < 0.05$).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

Format As

Protein Summary (deprecated)

Help

Significance threshold $p < 0.05$

Max. number of hits 5

Standard scoring

☒ MudPIT scoring

☐ Ions score or expect cut-off 0

Show sub-sets 0

Show pop-ups

☒ Suppress pop-ups

☐ Sort unassigned

Decreasing Score

☒ Require bold red

Re-Search All

Search Unmatched

Index

Accession	Mass	Score	Description
1. gi 825671	31090	128	B23 nucleophosmin (280 AA) [Homo sapiens]
2. gi 73953446	13211	108	PREDICTED: similar to Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar phosphoprotein B23) (Numatrin) (Nucleolar protein N
3. gi 73953448	12682	108	PREDICTED: similar to Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar phosphoprotein B23) (Numatrin) (Nucleolar protein N
4. gi 145580492	13629	108	Chain A, Crystal Structure Of Human Nucleophosmin-Core
5. gi 14554987	16650	107	PREDICTED: similar to nucleophosmin - human isoform 1 [Pan troglodytes]

MASCOT Mascot Search Results

Peptide View

MS/MS Fragmentation of **VDNDENEHQLSLR**

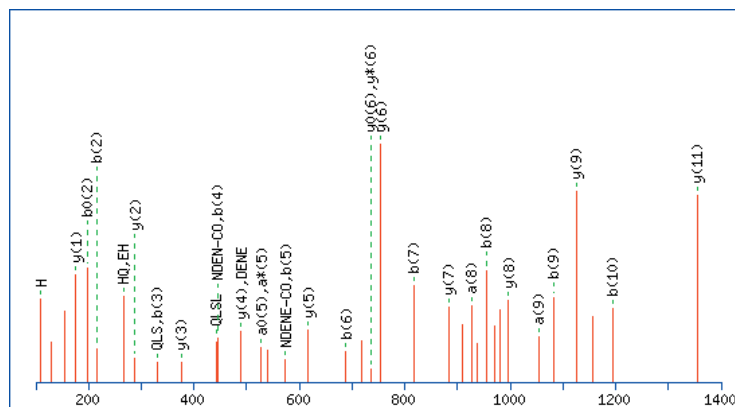
Found in **gi|112077**, nucleolar phosphoprotein B23.1 - rat

Match to Query 1: 1567.733724 from(1568.741000,1+) intensity(0.0000)

From data file DATA.TXT

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, 100 to Da



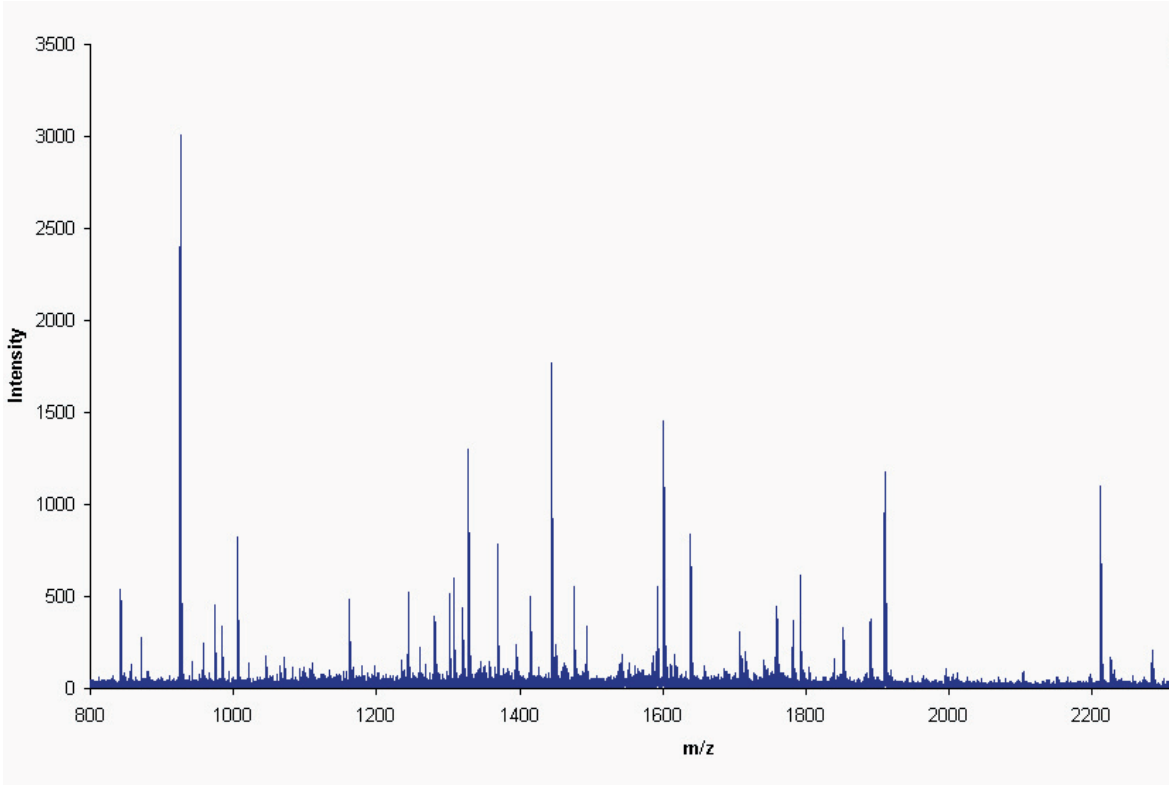
Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1567.7226

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Ions Score: 87 **Expect:** 1.5e-06

Matches (Bold Red): 34/207 fragment ions using 31 most intense peaks

6. ILF3

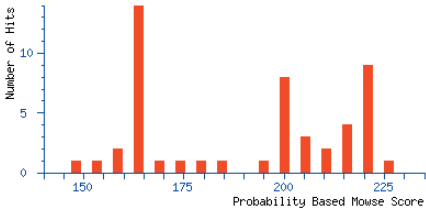


Mascot Search Results

User : emi
Email : proteomics.maldi@cnic.es
Search title :
Database : NCBIInr 20080229 (6251073 sequences; 2135462495 residues)
Timestamp : 6 Mar 2008 at 11:12:57 GMT
Top Score : 226 for **Mixture 1**, gi|1770456 + gi|9663122

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 80 are significant ($p < 0.05$).



Protein Summary Report

Format As

Protein Summary

Help

Significance threshold $p < 0.05$

Max. number of hits 5

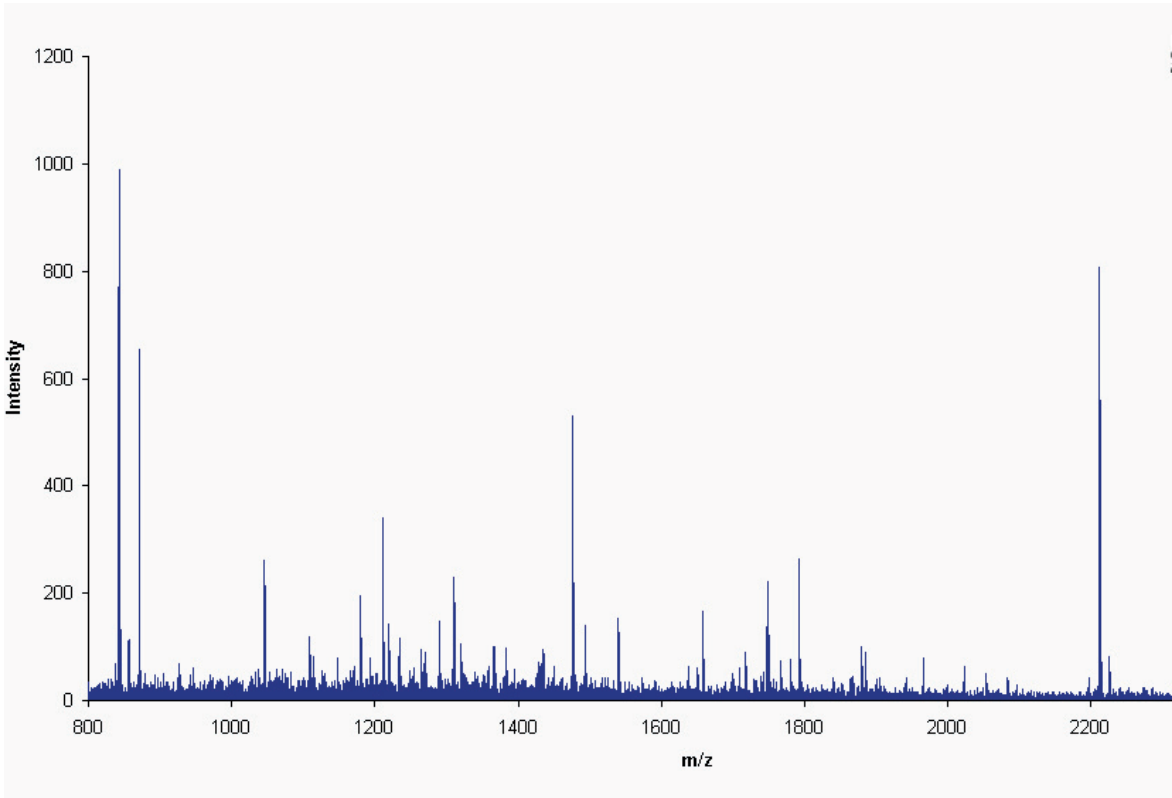
Re-Search All

Search Unmatched

Index

Accession	Mass	Score	Description
1. Mixture 1		226	gi 1770456 + gi 9663122
2. gi 24234756	74959	221	interleukin enhancer binding factor 3 isoform c [Homo sapiens]
3. gi 114675411	75484	220	PREDICTED: interleukin enhancer binding factor 3 isoform 3 [Pan troglodytes]
4. gi 114675415	75972	220	PREDICTED: interleukin enhancer binding factor 3 isoform 4 [Pan troglodytes]
5. gi 24234753	76441	220	interleukin enhancer binding factor 3 isoform b [Homo sapiens]

7. G3BP

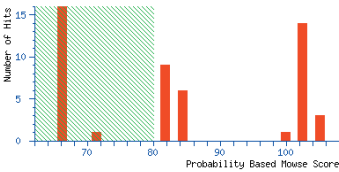


{MATRIX}
{SCIENCE} Mascot Search Results

User : emi
Email : proteomics.maldi@cnic.es
Search title :
MS data file : DATA.TXT
Database : NCBI nr 20080229 (6251073 sequences; 2135462495 residues)
Timestamp : 6 Mar 2008 at 11:42:02 GMT
Warning : A Peptide summary report will usually give a much clearer picture of MS/MS search results.
Top Score : 105 for gi|114602993, PREDICTED: similar to GAP SH3 binding protein isoform 2 [Pan troglodytes]

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \times \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 80 are significant ($p < 0.05$).
Protein scores are derived from ion scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

[Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits

Standard scoring ☒ MudPIT scoring ☐ Ions score or expect cut-off 0 Show sub-sets

Show pop-ups ☒ Suppress pop-ups ☐ Sort unassigned ☐ Decreasing Score ☐ Require bold red ☐

Index

Accession	Mass	Score	Description
1. gi 114602993	44741	105	PREDICTED: similar to GAP SH3 binding protein isoform 2 [Pan troglodytes]
2. gi 173953619	48659	104	PREDICTED: similar to Ras-GTPase-activating protein binding protein 1 (GAP SH3-domain binding protein 1)
3. gi 114602987	48720	104	PREDICTED: Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein isoform 10 [Pan troglodytes]
4. gi 114602985	49566	103	PREDICTED: hypothetical protein isoform 9 [Pan troglodytes]
5. gi 57085257	52096	103	PREDICTED: similar to Ras-GTPase-activating protein binding protein 1 (GAP SH3-domain binding protein 1)

Mascot Search Results

Peptide View

MS/MS Fragmentation of **FYVHNDIFR**

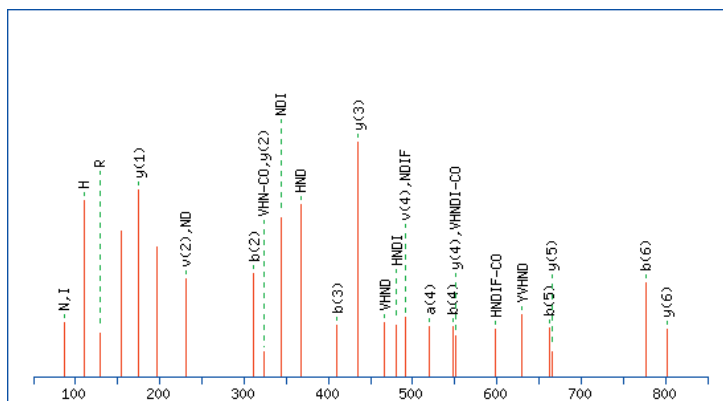
Found in **gi|5031703**, Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein [Homo sapiens]

Match to Query 2: 1209.594824 from(1210.602100,1+) intensity(0.0000)

From data file DATA.TXT

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, 50 850



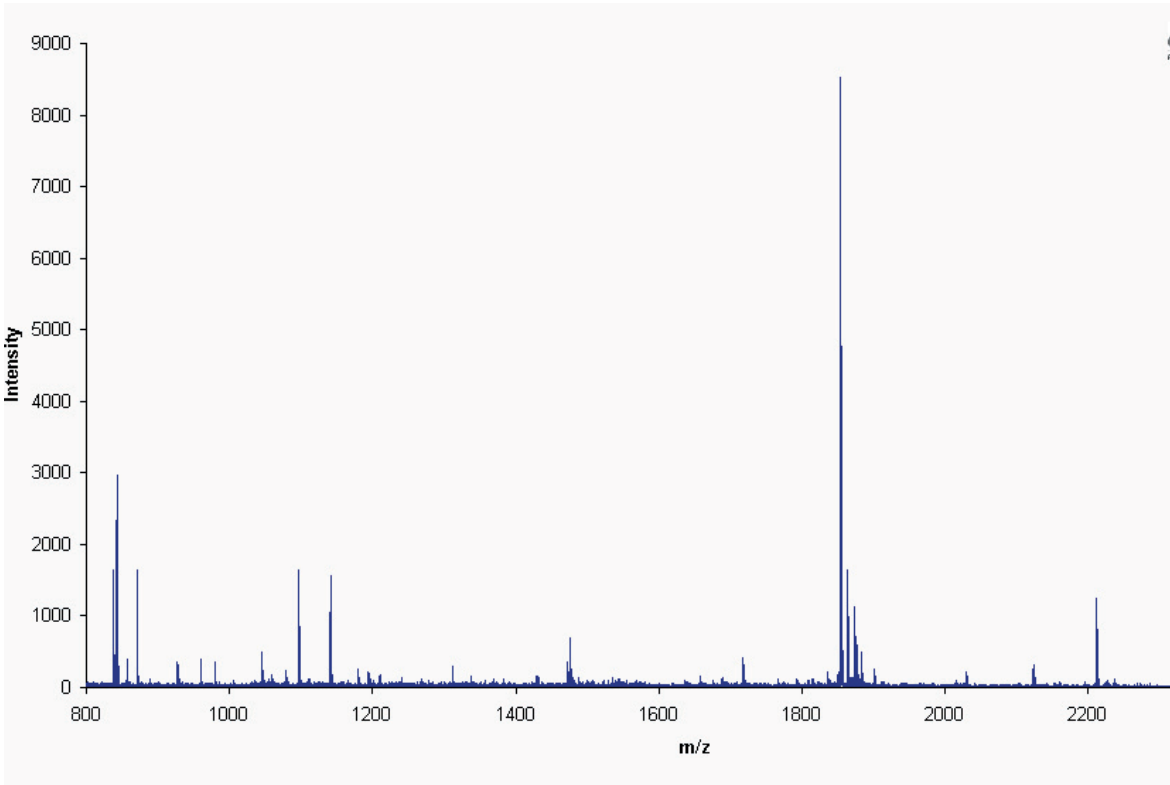
Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1209.5930

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Ions Score: 55 **Expect:** 0.004

Matches (Bold Red): 28/111 fragment ions using 25 most intense peaks

8. IMP1

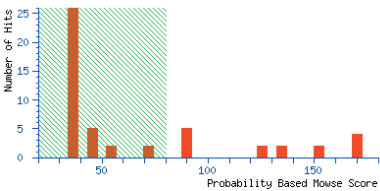


Mascot Search Results

User : emi
Email : proteomics.maldi@cnic.es
Search title :
Database : NCBIInr 20080229 (6251073 sequences; 2135462495 residues)
Timestamp : 6 Mar 2008 at 11:24:41 GMT
Top Score : 170 for [gi|173966275](#), PREDICTED: similar to IGF-II mRNA-binding protein 1 [Canis familiaris]

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 80 are significant ($p < 0.05$).



Protein Summary Report

Format As

Protein Summary

Help

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits 5

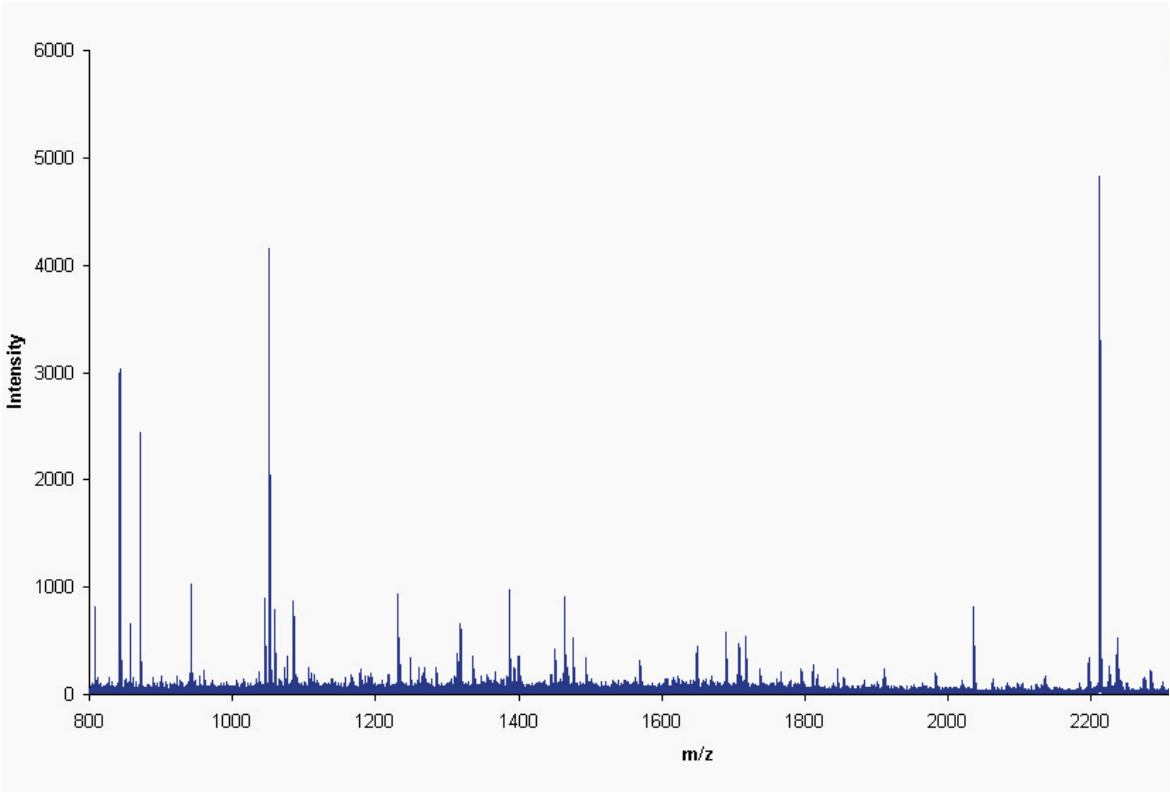
Re-Search All

Search Unmatched

Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi 173966275	63768	170	PREDICTED: similar to IGF-II mRNA-binding protein 1 [Canis familiaris]
2.	gi 56237027	63783	170	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1 [Homo sapiens]
3.	gi 28212254	63739	170	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1 [Rattus norvegicus]
4.	gi 114666310	63769	170	PREDICTED: insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1 isoform 2 [Pan troglodytes]
5.	gi 109114230	63790	148	PREDICTED: similar to insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1 [Macaca mulatta]

9. PROTEÍNA RIBOSOMAL L8

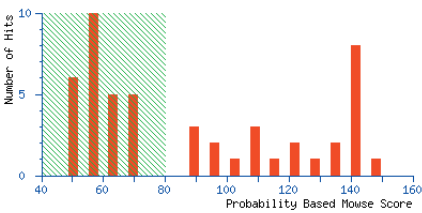


Mascot Search Results

User : emi
Email : proteomics.maldi@cnic.es
Search title :
MS data file : DATA.TXT
Database : NCBI nr 20080229 (6251073 sequences; 2135462495 residues)
Timestamp : 6 Mar 2008 at 11:28:54 GMT
Warning : A Peptide summary report will usually give a much clearer picture of MS/MS search results.
Top Score : 148 for gi|114622255, PREDICTED: similar to Ribosomal protein L8 isoform 2 [Pan troglodytes]

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 80 are significant ($p < 0.05$).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

Format As

Protein Summary (deprecated)

Help

Significance threshold $p < 0.05$

Max. number of hits 5

Standard scoring ☒ MudPIT scoring ☐ Ions score or expect cut-off 0

Show sub-sets 0

Show pop-ups ☒ Suppress pop-ups ☐ Sort unassigned | Decreasing Score

☒ Require bold red ☐

Re-Search All

Search Unmatched

Index

Accession	Mass	Score	Description
1. gi 114622255	23432	148	PREDICTED: similar to Ribosomal protein L8 isoform 2 [Pan troglodytes]
2. gi 4506663	28235	143	ribosomal protein L8 [Homo sapiens]
3. gi 62287198	28263	143	60S ribosomal protein L8
4. gi 74226881	28277	143	unnamed protein product [Mus musculus]
5. gi 15082586	28221	143	Ribosomal protein L8 [Homo sapiens]

MASCOT Mascot Search Results

Peptide View

MS/MS Fragmentation of **VVFRDPYR**

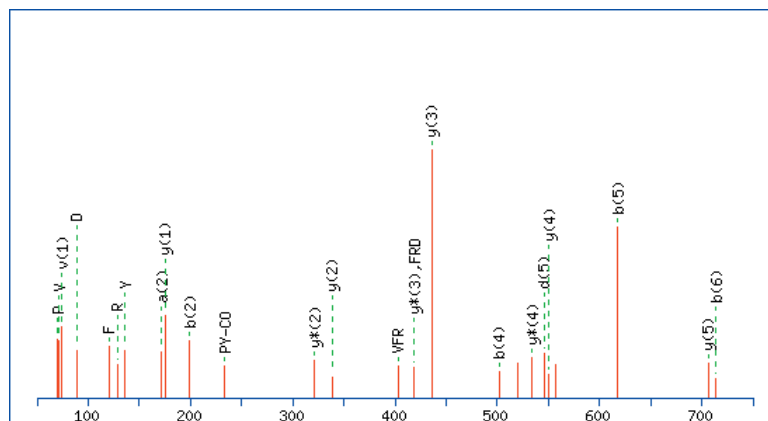
Found in **gi|3088346**, ribosomal protein L8 [Homo sapiens]

Match to Query 3: 1050.555724 from(1051.563000,1+) intensity(0.0000)

From data file DATA.TXT

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, 50 to 750 Da



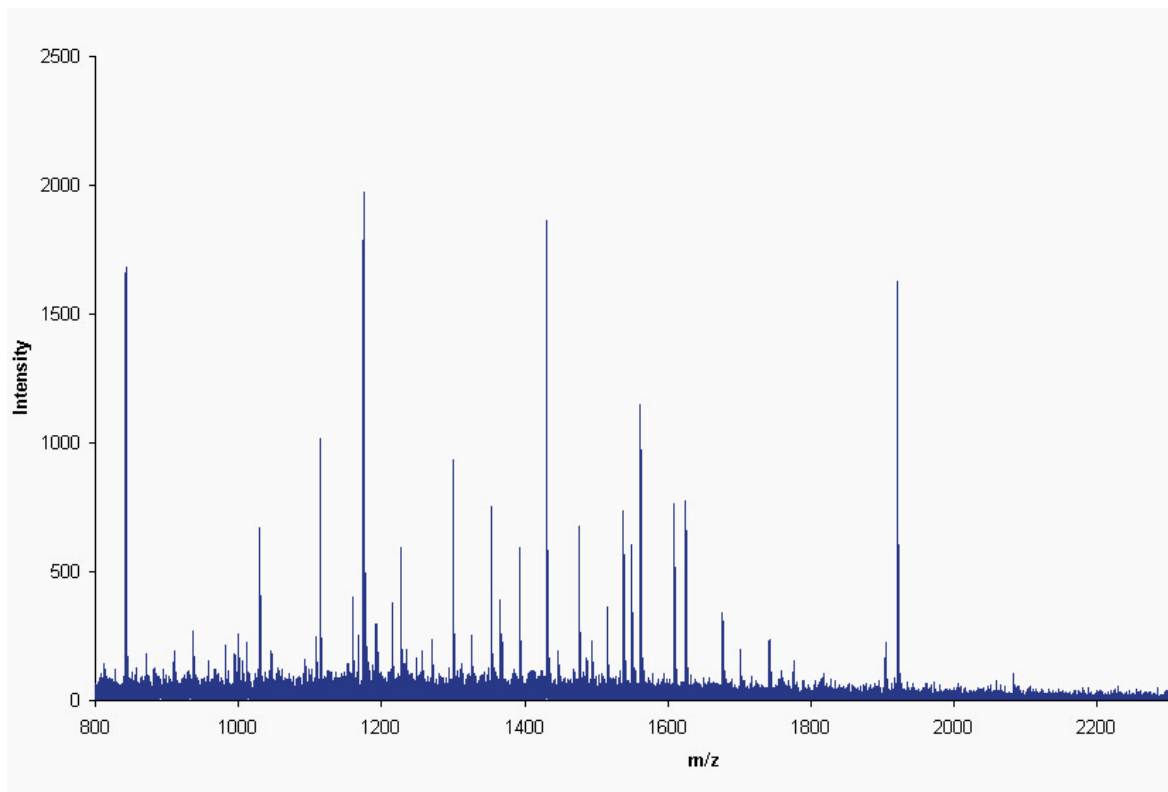
Monoisotopic mass of neutral peptide **Mr(calc)**: 1050.5610

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Ions Score: 45 Expect: 0.044

Matches (**Bold Red**): 27/97 fragment ions using 25 most intense peaks

10. ACTININA 4

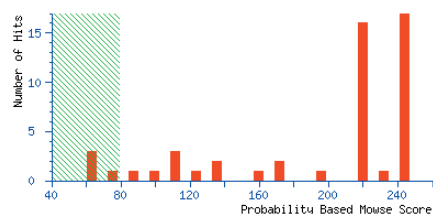


Mascot Search Results

User : emi
 Email : proteomics.maldi@cnic.es
 Search title :
 Database : NCBIInr 20070104 (4385804 sequences; 1511069064 residues)
 Timestamp : 10 Jan 2007 at 15:24:44 GMT
 Top Score : 244 for **gi|119577215**, actinin, alpha 4, isoform CRA_c [Homo sapiens]

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 79 are significant ($p < 0.05$).



Protein Summary Report

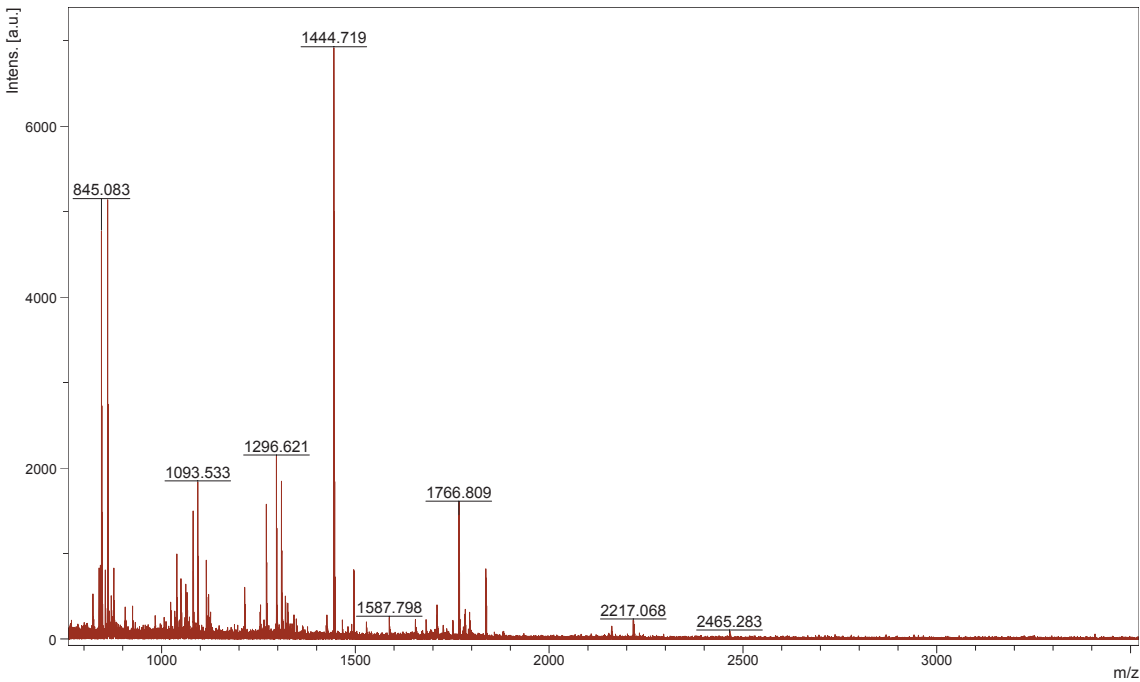
Format As [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits 5

Index

Accession	Mass	Score	Description
1. gi 119577215	104555	244	actinin, alpha 4, isoform CRA_c [Homo sapiens]
2. gi 76641273	108492	243	PREDICTED: similar to actinin, alpha 4 isoform 10 [Bos taurus]
3. gi 12025678	105245	243	actinin, alpha 4 [Homo sapiens]
4. gi 75070852	105246	243	Alpha-actinin-4 (Non-muscle alpha-actinin 4) (F-actin cross-linking protein)
5. gi 76641255	105319	243	PREDICTED: similar to actinin, alpha 4 isoform 2 [Bos taurus]

11. VIMENTINA

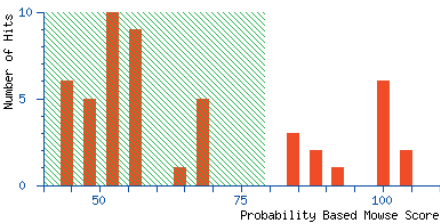


Mascot Search Results

User : SILVIA
Email : sjuarez@cnb.uam.es
Search title :
Database : NCBI nr 20070216 (4626804 sequences; 1596079197 residues)
Timestamp : 21 Feb 2007 at 13:28:49 GMT
Top Score : 104 for [gi|2078001](#), vimentin [Mus musculus]

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 79 are significant ($p < 0.05$).



Protein Summary Report

Format As

Protein Summary

Help

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits 10

Re-Search All

Search Unmatched

Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi 2078001	51590	104	vimentin [Mus musculus]
2.	gi 1353212	51874	103	Vimentin
3.	gi 31982755	53712	101	vimentin [Mus musculus]
4.	gi 74185445	53582	101	unnamed protein product [Mus musculus]
5.	gi 74199770	53772	101	unnamed protein product [Mus musculus]
6.	gi 155408	53746	101	vimentin [Mus musculus]
7.	gi 14389299	53757	101	vimentin [Rattus norvegicus]
8.	gi 138535	53754	100	Vimentin
9.	gi 860908	44611	90	vimentin [Cricetulus griseus]
10.	gi 74214018	47205	90	unnamed protein product [Mus musculus]

Material suplementario A2: Revisión bibliográfica sobre las β -mRNA-BPs

DHX9 pertenece a la familia de las DExD/H helicasas dependientes de ATP y se la conoce también como RNA helicase I (RHA), Nuclear DNA helicase II o DEAH box protein 9 (Abdelhaleem y cols., 2003). Es ubicua y presenta dos dominios dsRBD, el dominio helicasa común de la familia y una caja RGG hacia el extremo Ct (Zhang y Grosse, 1997). Su localización es nuclear y nucleolar (Zhang y cols., 1999), aunque también realiza transporte bidireccional núcleo-citoplasma (Tang y cols., 1999). Presenta actividad dsDNA/RNA helicasa dependiente de ATP en dirección 3'-5' que altera la interacción de los ácidos nucleicos con las proteínas. Recientemente se ha descrito que esta actividad favorece el desensamblaje de RNPs en determinadas condiciones, promoviendo así la dinámica de asociación-disociación de factores (Jankowsky y Bowers, 2006). DHX9 se une al coactivador CBP y recluta a la RNA pol II favoreciendo la transcripción de genes en respuesta a señales a cAMP (Nakajima y cols., 1997). Además, está implicada en la exportación de mRNA al citoplasma ya que interacciona con el homólogo humano de Mex67 (TAP) (Tang y Wong-Staal, 2000). De hecho, esta interacción asistida por otras RBPs como SAM68 y AKAP95 promueve la exportación de mRNAs retrovirales (Reddy y cols., 2000). Por otro lado, se ha descrito que DHX9 promueve la transcripción de HIV (Fujii y cols., 2001), se asocia a gag y finalmente se incorpora a las partículas virales (Roy y cols., 2006).

SFPQ (PSF, hPOMp100) y **NonO** (p54^{nrb}) son dos proteínas nucleares que presentan homología en su mitad Ct (dos dominios RRM y un tramo de aa cargados; SFPQ tiene además una caja RGG en su extremo Nt) y se encuentran frecuentemente asociadas como heterómero (Shav-Tal y Zipori, 2002). Se expresan en todos los tejidos y se localizan en el núcleo donde transitan entre distintos dominios (*paraspeckles*, nucleoplasma, membrana nuclear) (Fox y cols., 2002). SFPQ se describió originalmente como un factor de splicing asociado a PTB con afinidad por tramos ricos en pirimidinas y NonO como un factor nuclear con afinidad por RNA homólogo a nonA de *Drosophila* (Shav-Tal y Zipori, 2002). Posteriormente se ha demostrado que forman un dímero multifuncional. SFPQ-NonO favorece la transcripción a través de su interacción con el dominio CTD de la RNA pol II (Emili y cols., 2002) y promueve su terminación y el procesamiento del RNA en 3' mediante el reclutamiento de XRN2 (Kaneko y cols., 2007). Además, SFPQ-NonO es esencial para el splicing *in vitro* y se une a U5 RNA (Peng y cols., 2002; Shav-Tal y Zipori, 2002). Se ha propuesto que esta función dual en transcripción

y *splicing* es esencial para el acoplamiento de ambos procesos, demostrando la existencia de un megacomplejo integrado por la RNA pol II y la maquinaria de *splicing* (Kameoka y cols., 2004; Rosonina y cols., 2005). Finalmente, el dímero SFPQ-NonO retiene RNAs excesivamente editados evitando su exportación y traducción aberrante en el citoplasma (Zhang y Carmichael, 2001).

La **nucleolina**, también conocida como C23 o NCL, es una de las proteínas mayoritarias del nucleolo, aunque puede localizarse también en el nucleoplasma, citoplasma y membrana plasmática. Presenta un dominio de aminoácidos ácidos en su extremo Nt, seguido de cuatro dominio RRM y una caja RGG en su extremo Ct (Ginisty y cols., 1999). Está implicada en todos los pasos de biogénesis ribosomal, incluyendo la regulación de la transcripción mediada por la RNA pol I (Rickards y cols., 2007), probablemente mediante una actividad chaperona de histonas (Angelov y cols., 2006), el plegamiento del rRNA, el ensamblaje de las partículas ribosomales y su exportación al citoplasma (Ginisty y cols., 1999). Durante la infección viral NCL se transloca al citoplasma donde interacciona con IRES presentes en las regiones 5' y 3' de RNAs de virus de la polio y picornavirus, promoviendo la traducción dependiente de IRES (Izumi y cols., 2001). Además, en células endoteliales angiogénicas se localiza en la membrana plasmática (Christian y cols., 2003) asistido por VEGF, donde actúa como receptor de células tumorales (Shi y cols., 2007).

La **nucleofosmina** (NPM1, Numatrin, B23, No38) pertenece a la familia nucleoplasmina de chaperones. Contiene el dominio de homología nucleoplasmina, que incluye tres tramos de aminoácidos ácidos, una señal de localización nuclear y una de exportación, y un dominio Ct de unión a ácidos nucleicos. Es ubicua, multifuncional y puede localizarse en el núcleo y en el citoplasma, siendo una de las proteínas mayoritarias del nucleolo. Así, está implicada en la maduración de los pre-rRNAs (Savkur y Olson, 1998) así como en el transporte núcleo-citoplasma de partículas ribosomales en conjunción con la nucleolina (Borer y cols., 1989). Asimismo, presenta actividad chaperona de histonas (Okuwaki y cols., 2001) e induce la transcripción favoreciendo el reclutamiento de p300 a los nucleosomas y la acetilación de histonas (Swaminathan y cols., 2005). Además, se ha demostrado recientemente que se asocia específicamente a mRNAs que han concluido la poliadenilación sugiriendo un papel como marca de calidad del correcto procesamiento de mRNAs maduros (Palaniswamy y cols., 2006). Por otro lado, muchos trabajos describen la interacción de NPM con proteínas virales y los efectos pleiotrópicos

derivados del secuestro de esta proteína y de la promoción de la replicación y ensamblaje de partículas virales (Miyazaki y cols., 1995; Li, 1997; Mai y cols., 2006; Bevington y cols., 2007; Samad y cols., 2007). Además, los ratones *npm^{-/-}* muestran letalidad embrionaria y organogénesis aberrante debido a una duplicación descontrolada del centrosoma y a inestabilidad genómica (Grisendi y cols., 2005), lo que justifica en gran medida la relevancia de esta proteína en el desarrollo de múltiples tipos de leucemias (Grisendi y cols., 2006).

ILF3 (NF90, DRBP76, NFAR, MPP4) fue originalmente descrita como un factor nuclear de células T activadas que regula la expresión de IL-2 aunque hoy sabemos que se expresa en todos los tejidos y que se encuentra mayoritariamente asociado a la cromatina aunque también se transporta bidireccionalmente núcleo-citoplasma (Shi y cols., 2005). Contiene un dominio DZF, 2 dominios dsRBM y una caja RGG en el extremo Ct (Tian y cols., 2004). Puede actuar como regulador positivo o negativo de la transcripción dependiendo del entorno del promotor (Reichman y cols., 2002). NF90 se fosforila y se exporta al citoplasma específicamente cuando se desencadena la mitosis (Parrott y cols., 2005; Shi y cols., 2005) e interviene en la exportación de RNAs que contienen elementos específicos dsRNA como RNAs virales (Gwizdek y cols., 2004). Además, interacciona y es fosforilado por PKR, aunque la relevancia fisiológica de esta fosforilación todavía no se ha determinado (Parker y cols., 2001). En este sentido, y como parte activa de la respuesta del hospedador contra la infección viral, se ha descrito que NF90 puede inhibir la traducción dependiente de IRES de RNAs virales como el de rinovirus tipo 2 (Merrill y Gromeier, 2006) aunque, por otro lado, se asocia al genoma de HCV y es esencial junto con RHA para la replicación viral (Isken y cols., 2007). Finalmente, esta proteína parece ser un regulador general de la diferenciación muscular dado que ratones KO para ILF3 muestran letalidad perinatal debida a un fallo neuromuscular respiratorio que se justifica por defectos en MyoD y miogenina (Shi y cols., 2005).

G3BP (ATP-dependent DNA helicase VIII, GAP SH3 domain binding protein) se identificó como una proteína ubicua que co-inmunoprecipita con la proteína activadora de la función GTPasa de Ras o p120^{GAP}. Desde el amino al carboxilo, G3BP presenta un dominio NTF2, un tramo de aminoácidos ácidos, un dominio RRM y una caja RGG (Parker y cols., 1996). En células proliferantes interacciona con p120^{GAP} y puede localizarse en la membrana plasmática (Gallouzi y cols., 1998). En células quiescentes, G3BP está hiperfosforilada, se encuentra

parcialmente localizada en el núcleo y adquiere una actividad endoribonucleasa que desestabiliza el mRNA de cMyc. La importación al núcleo y la actividad RNasa están asociadas con la fosforilación en la S149, cuya quinasa responsable aún no ha sido identificada (Tourriere y cols., 2001). Más recientemente se ha puesto de manifiesto el papel de G3BP en situaciones de estrés celular. En condiciones de estrés oxidativo, metabólico o mitocondrial, choque térmico e incluso infecciones virales, G3BP se localiza en gránulos de estrés (SGs) (Kedersha y cols., 2005; White y cols., 2007). Además, la formación de SGs en respuesta a estrés oxidativo depende de la des-fosforilación de la S149 de G3BP y su sobre-expresión *per se* promueve la el ensamblaje de SGs (Tourriere y cols., 2003). Al igual que en el caso de NF90, G3BP puede representar una primera barrera celular en respuesta a la infección viral ya que es sustrato para la proteasa 3C de poliovirus en etapas tempranas de la infección promoviendo el desensamblaje de los SGs (White y cols., 2007). Por otro lado, forma parte de las factorías virales de poxvirus (Katsafanas y Moss, 2007) y del replicón de HCV (Yi y cols., 2006). El fenotipo del ratón KO de G3BP presenta letalidad embrionaria y crecimiento retardado, que se asocia con defectos en el control de genes implicados en regulación de la proliferación (Lypowy y cols., 2005; Zekri y cols., 2005).

IMP1 pertenece a la familia VICKZ (Vg1 RBP/Vera, IMP1-3, CRD-BP, KOC, ZBP-1), cuyos miembros son proteínas homólogas identificadas contemporáneamente en distintos sistemas experimentales. Comparten en torno a un 70% de identidad de secuencia y comprenden dos dominios RRM, una caja RGG y cuatro dominios KH. Presentan un patrón de expresión oncofetal. En todos los sistemas han destacado por su relevancia para la localización y traducción de distintos mRNAs y por su implicación en cáncer (Ross y cols., 1997; Doyle y cols., 1998; Havin y cols., 1998; Nielsen y cols., 1999; Zhang y cols., 1999). ZBP1 se une a una zona del mRNA de β -actina denominada *zip-code* y se localizan en el extremo conductor de fibroblastos de pollo (Ross y cols., 1997). La asociación RNA-proteína se produce en el núcleo mediante un proceso asistido por otras proteína, se translocan al citoplasma (Pan y cols., 2007), y se transportan hasta el extremo conductor a través de microfilamentos y un motor de miosina (Oleynikov y Singer, 2003). Una vez en el extremo, ZBP1 puede ser fosforilada por Src, promoviendo la disociación del mRNA de β -actina (Huttelmaier y cols., 2005). IMP1 controla la localización y traducción del mRNA de IGF-II durante el desarrollo embrionario (Nielsen y cols., 1999). En el citoplasma forma gránulos de gran tamaño (~ 200-700 nm) que incluyen otras proteínas y mRNAs y que pueden desplazarse a través de microtúbulos (Nielsen y cols., 2002; Jonson y cols., 2007). Su disociación del

mRNA favorece su re-importación al núcleo, donde se unirá mRNA comenzando así un nuevo ciclo (Nielsen y cols., 2003). Además, esta proteína se une a un elemento en la región codificante del mRNA de cMyc (CRD) y lo estabiliza (Doyle y cols., 1998) dado que le protege de la acción de una endorribonucleasa (Sparanese y Lee, 2007). El animal *imp1^{-/-}* presenta letalidad perinatal, retraso en el crecimiento, alteraciones en la producción de cartílago e hipoplasia intestinal (Hansen y cols., 2004). Curiosamente, hasta el momento no se ha descrito su implicación en infecciones virales aunque se han identificado IMP1, 2 y 3 en una riboproteómica del IRES de HCV (Lu y cols., 2004).

HuR pertenece a la familia ELAV y, a diferencia del resto de miembros específicos de neuronas, se expresa de forma ubicua. Contiene 3 dominos RRM y presenta afinidad por elementos ricos en AU (ARE) (May y cols., 1996). Inicialmente se describió como un factor estabilizador de mRNA (Levy y cols., 1998) y se comporta más frecuentemente como un regulador post-transcripcional positivo aunque también se han identificado dianas a las que regula negativamente (Katsanou y cols., 2005; Meng y cols., 2005; Leandersson y cols., 2006). HuR está implicada en el control del ciclo celular (Wang y cols., 2000), senescencia (Wang y cols., 2005), inflamación (Katsanou y cols., 2005), apoptosis (Abdelmohsen y cols., 2007), oncogénesis (Lopez de Silanes y cols., 2005) y respuesta celular a diferentes tipos de estrés (Wang y cols., 2000; Jeyaraj y cols., 2005; Kedersha y cols., 2005; Abdelmohsen y cols., 2007). Se ha descrito que HuR ejerce su actividad en el citoplasma y que el transporte bidireccional núcleo-citoplasma depende de diversas señales (Wang y cols., 2000; Wang y cols., 2002). Aunque el análisis del fenotipo del mutante de su homólogo en *Drosophila* se describió hace tiempo, todavía no se ha desarrollado un modelo animal KO de HuR.

ANEXO II

ACCELERATED PUBLICATION

Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer

Antonio ISIDORO*, Marta MARTÍNEZ*, Pedro L. FERNÁNDEZ†, Álvaro D. ORTEGA*, Gema SANTAMARÍA*, Margarita CHAMORRO*, John C. REED‡ and José M. CUEZVA*¹

*Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa' (CBMSO), C.S.I.C.-U.A.M., Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain, †Departamento de Anatomía Patológica, IDIBAPS, Hospital Clínico y Universidad de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain, and ‡The Burnham Institute, 10901 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, U.S.A.

Recent findings indicate that the expression of the β -catalytic subunit of the mitochondrial H^+ -ATP synthase (β -F₁-ATPase) is depressed in liver, kidney and colon carcinomas, providing further a bioenergetic signature of cancer that is associated with patient survival. In the present study, we performed an analysis of mitochondrial and glycolytic protein markers in breast, gastric and prostate adenocarcinomas, and in squamous oesophageal and lung carcinomas. The expression of mitochondrial and glycolytic markers varied significantly in these carcinomas, when compared

with paired normal tissues, with the exception of prostate cancer. Overall, the relative expression of β -F₁-ATPase was significantly reduced in breast and gastric adenocarcinomas, as well as in squamous oesophageal and lung carcinomas, strongly suggesting that alteration of the bioenergetic function of mitochondria is a hallmark of these types of cancer.

Key words: cancer, glycolysis, H^+ -ATP synthase, mitochondria.

INTRODUCTION

The H^+ -ATP synthase is the mitochondrial protein complex responsible for harnessing cellular ATP [1]. Efficient execution of programmed cell death also requires the activity and molecular components of the H^+ -ATP synthase [2–4]. Recently, decreased expression of the β -catalytic subunit of the H^+ -ATP synthase (β -F₁-ATPase or β F₁ in ratios) has been demonstrated in liver, kidney and colon carcinomas [5]. These findings provide molecular evidence that support an altered bioenergetic function of mitochondria in these types of cancer [5], in agreement with the Warburg hypothesis [6]. In this regard, we defined a bioenergetic cellular index (BEC index) that could be used to estimate tumour status [5]. The BEC index takes into consideration the expression level of a bioenergetic marker of mitochondria relative to a cellular glycolytic marker, which can be easily determined in tissue biopsies by immunohistochemical or immunoblotting analysis [5]. The down-regulation of the β -F₁-ATPase protein and assessment of the BEC index in colon carcinomas was shown further to have prognostic value in assessing the clinical outcome of patients with early-stage disease [5].

The possible impairment of the bioenergetic function of mitochondria in other human tumours has not been explored. In the present study, we have examined the expression of β -F₁-ATPase as protein marker of oxidative phosphorylation and of hsp60 (heat-shock protein 60) as marker of structural mitochondrial protein, in combination with two markers of the glycolytic pathway [GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and PK (pyruvate kinase)], in randomly selected biopsies of primary breast, gastric and prostate adenocarcinomas, and in squamous lung and oesophageal carcinomas, as well as in the normal tissue biopsies of the same patients. We show that the expression of β -F₁-ATPase, either alone or in combination

with mitochondrial and glycolytic markers (as defined by the BEC index), is significantly diminished in breast, gastric, lung and oesophageal cancers. Overall, the findings suggest that an impaired bioenergetic function of mitochondria is a hallmark of carcinogenesis in these human tissues. Furthermore, we suggest that the bioenergetic signature could provide a convenient tool for the diagnosis of patients bearing breast, lung, gastric and oesophageal cancers.

EXPERIMENTAL

Patient specimens

Frozen tissue sections of 17 μ m thickness, obtained from human biopsies of untreated patients with primary ductal invasive breast adenocarcinomas, gastric and prostate adenocarcinomas, and squamous oesophageal and lung carcinomas, were obtained from the Banco de Tejidos y Tumores, IDIBAPS (Instituto de Investigaciones Biomédicas Augusto Pi y Suñer), Hospital Clinic, Barcelona, Spain. The tissue sections of the tumour and normal tissue of each patient were analysed previously by an expert pathologist. All tissue samples used in the present study were anonymized and received in a coded form to protect patient confidentiality under IRB (Internal Review Board) approval.

Protein extraction

Approx. 20 tissue sections were extracted in 300 μ l of 50 mM Tris/HCl, pH 8, containing 150 mM NaCl, 0.02% (w/v) sodium azide, 0.1% (w/v) SDS, 1% (v/v) Nonidet P40, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml antitrypsin, 0.4 mM EDTA, 10 mM NaF and 0.75 mM PMSF at 4 °C for 30 min. After protein extraction, the

Abbreviations used: β -F₁-ATPase, β -subunit of the mitochondrial H^+ -ATP synthase; BEC index, bioenergetic cellular index; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; hsp60, heat-shock protein 60; PK, pyruvate kinase.

¹ To whom correspondence should be addressed (e-mail jmcuezva@cbm.uam.es).

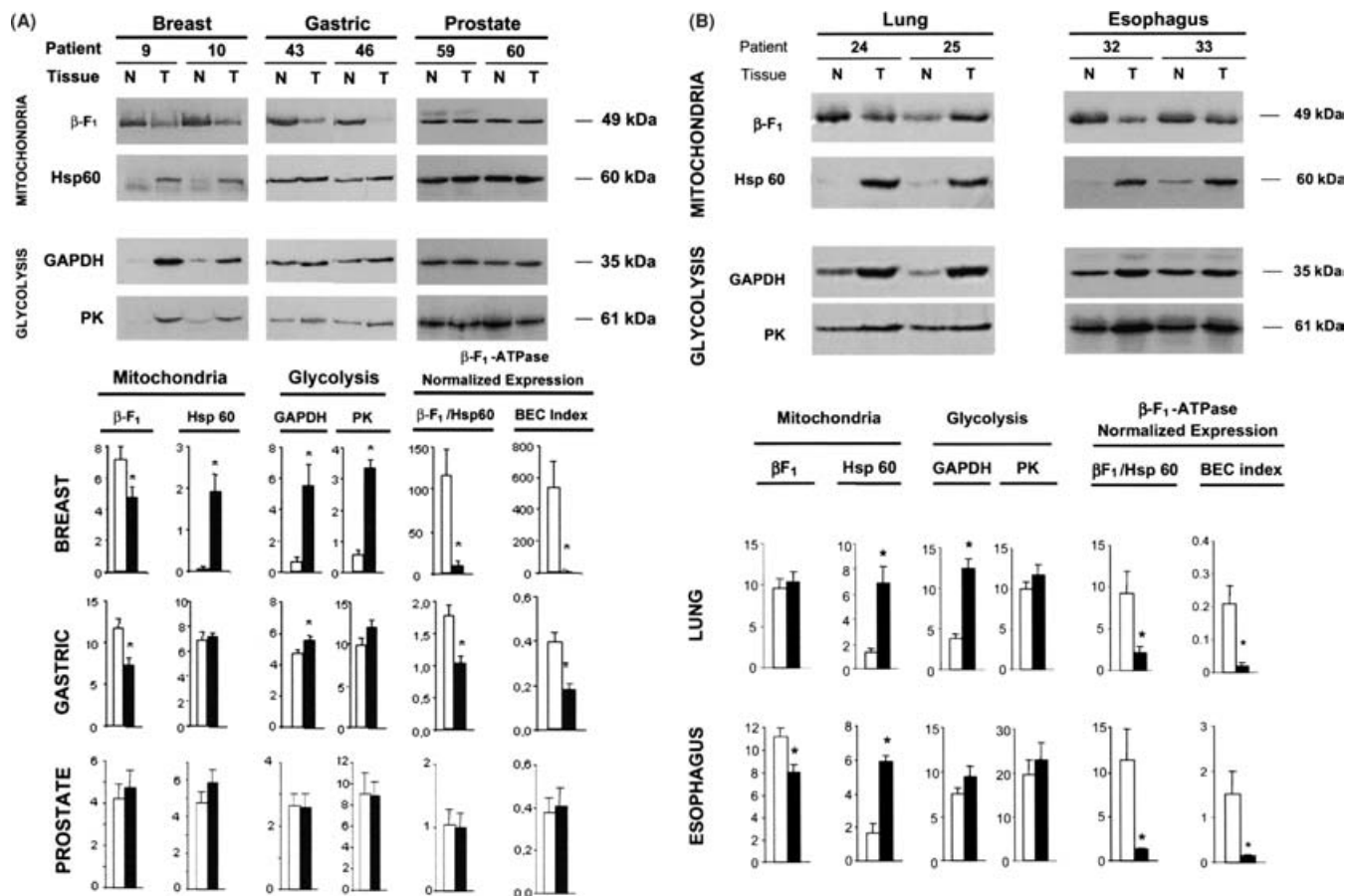


Figure 1 Expression of mitochondrial and glycolytic marker proteins in human tumours

Protein samples from normal (N) and tumour (T) biopsies from the same patient were fractionated by SDS/PAGE (10% or 15% gels) and then blotted with the corresponding antibodies. Markers of oxidative phosphorylation (β -F₁-ATPase) and structural function (hsp60) of the mitochondria and of the glycolytic pathway (GAPDH and PK) were studied. The electrophoretic migration (kDa) of each marker is shown on the right-hand side of the Figure. For illustration purposes, the results of two patients are shown for each type of carcinoma. The histograms show the means \pm S.E.M. of the cellular content of each marker as determined by densitometric analysis (arbitrary units) in normal (open bars) and tumour (closed bars) biopsies. The β F₁/hsp60 ratio and BEC index (β F₁/hsp60/GAPDH ratio) provide a normalized expression level of β -F₁-ATPase for each sample. **P* < 0.05 when compared with normal tissue by Student's *t* test. (A) Breast (*n* = 10), gastric (*n* = 10) and prostate (*n* = 9) adenocarcinomas. (B) Squamous lung (*n* = 9) and oesophageal (*n* = 6) carcinomas.

samples were centrifuged (15000 *g*) at 4 °C for 25 min. The protein concentration in the supernatants was determined with the Bradford reagent (Bio-Rad Protein Assay) using BSA as standard. Aliquots of the supernatants were stored at -80 °C until used.

Western blotting

Western blots for paired normal and tumour samples of the same patient were run in the same gel. Samples (15 or 30 μ g of protein) were subjected to SDS/PAGE (10% or 15% gels) followed by immunoblot analysis [7] using the appropriate dilution of various antisera. The antibodies used in the present study included: rabbit anti- β -F₁-ATPase at 1:20000 dilution [5]; mouse monoclonal anti-hsp60 (SPA 807; Stressgene, Victoria, Canada) at 1:2000 dilution; goat polyclonal anti-(muscle PK) at 1:2000 dilution and mouse monoclonal anti-GAPDH at 1:10000 dilution, both from Abcam (Cambridge, U.K.). Secondary horseradish-peroxidase-conjugated goat anti-rabbit, anti-mouse or rabbit anti-goat antibodies (1:3000 dilution) were used for detection, which was accomplished using an enhanced chemiluminescence detection method (ECL[®]; Amersham Biosciences). Quantification of the intensity of the immunoreactive bands (arbitrary units) was

accomplished using a Kodak DC120 Zoom digital camera and the Kodak 1D Image Analysis Software for Windows. To calculate the normalized expression level of β -F₁-ATPase, the band intensity of β -F₁-ATPase was divided by the band intensity of hsp60 assayed for the same sample and in the same membrane. To calculate the BEC index [5], the aforementioned ratio was normalized relative to the band intensity of GAPDH. Statistical analysis was performed using Student's *t* test for paired samples.

RESULTS

Breast adenocarcinomas

The analysis of the expression level of mitochondrial and glycolytic marker proteins in ten primary breast ductal invasive adenocarcinomas and in their corresponding paired normal tissue biopsies revealed that the levels of β -F₁-ATPase protein were reduced in seven of the tumours analysed (Figure 1A). In contrast, the expression of mitochondrial hsp60 was increased in all of the tumours analysed (Figure 1A). The glycolytic GAPDH and PK markers were elevated in 80% and 100% of the tumours analysed respectively (Figure 1A). The normalized expression

level of β -F₁-ATPase, as assessed by the β F₁/hsp60 ratio, showed a significant reduction in breast adenocarcinomas when compared with normal breast samples (Figure 1A). Likewise, the BEC index ($[\beta$ F₁/hsp60]/GAPDH ratio) showed that breast cancer samples have a BEC index much lower than that in the normal breast tissue (Figure 1A).

Gastric adenocarcinomas

The analysis of the expression level of β -F₁-ATPase in ten gastric adenocarcinomas and in their corresponding paired normal tissue samples revealed that the marker was significantly reduced in 90% of the tumours analysed (Figure 1A). In contrast, the expression of the mitochondrial hsp60 was not affected in gastric adenocarcinomas when compared with normal tissues (Figure 1A). A slight, marginally significant increase was observed in the expression of GAPDH, whereas PK was not significantly affected in adenocarcinomas of the stomach (Figure 1A). The expression of β -F₁-ATPase relative to that of hsp60 revealed a significant decrease of this ratio in all the tumours when compared with normal tissue (Figure 1A). Consistent with the above findings, the BEC index showed a significant decrease in the adenocarcinomas (Figure 1A).

Prostate adenocarcinomas

No significant differences were observed in the expression level of β -F₁-ATPase and hsp60 in nine prostate adenocarcinomas when compared with their corresponding normal tissue controls (Figure 1A). Likewise, the expression of GAPDH and PK was not significantly affected in prostate cancer (Figure 1A). Therefore the normalized expression levels of β -F₁-ATPase and BEC index were not altered in prostate adenocarcinomas (Figure 1A).

Squamous carcinomas of the lung

The expression of β -F₁-ATPase was not significantly altered in the nine squamous lung carcinomas analysed when compared with normal tissue (Figure 1B). However, the expression of hsp60 was significantly increased in the tumours (Figure 1B). An increased expression of GAPDH was also observed in all the carcinomas when compared with normal samples (Figure 1B). In contrast, the expression of PK was not significantly altered in squamous lung carcinomas (Figure 1B). The expression of β -F₁-ATPase normalized to hsp60 revealed a significant reduction in the tumours when compared with the normal tissue (Figure 1B). Consistent with the above findings, the BEC index revealed a significant decrease in squamous lung carcinomas when compared with normal lung (Figure 1B).

Squamous carcinomas of the oesophagus

Five of the six squamous oesophageal carcinomas analysed showed a significant reduction in the expression of β -F₁-ATPase when compared with its normal paired sample (Figure 1B). Interestingly, the expression of the mitochondrial hsp60 marker was significantly increased in the carcinomas when compared with the normal tissue (Figure 1B). The expression of GAPDH and PK was not significantly altered in oesophageal carcinomas (Figure 1B). Consistent with these findings, both the normalized expression level of β -F₁-ATPase (β F₁/hsp60 ratio) and the BEC-index revealed a significant decrease in the carcinomas (Figure 1B).

DISCUSSION

Large-scale genomic [8,9] and proteomic [10] techniques have allowed the analysis of the expression pattern of the genes and proteins that are associated with the phenotype of a particular type of tumour, providing its so-called 'cancer signature' [11,12]. We have recently shown that the mitochondrial and glycolytic phenotypes of colon carcinomas provide a bioenergetic signature of cancer that has prognostic value in clinical practice [5]. In the present paper, we have analysed the expression of a set of mitochondrial and glycolytic markers in other types of common human carcinomas to explore whether or not the alteration of the bioenergetic signature is a generalized condition of cancer. We show that, with the exception of prostate adenocarcinomas, the bioenergetic signature of cancer, as assessed by the absolute expression level of β -F₁-ATPase (breast, oesophagus and stomach) or by its relative expression when considering other mitochondrial and cellular proteins (lung, breast, oesophagus and stomach), provides a molecular marker of carcinogenesis. Although the expression level of a protein marker does not necessarily reflect the cellular activity of the protein, the findings reported in the present paper, in addition to previous observations in liver, kidney and colon carcinomas [5], strongly suggest that altered bioenergetic function of mitochondria is a hallmark of carcinogenesis, as was hypothesized by Warburg almost 80 years ago [6]. The probable metabolic consequence of this impairment is the increased production of cellular ATP by enhanced rates of glycolysis. In this regard, we observed that, with the exception of prostate and oesophageal cancer, the GAPDH marker of the glycolytic pathway is increased in breast, gastric, lung, kidney and colon tumours (Figures 1A and 1B; and [5]). However, in those tumours where PK has been determined (the present study), we only observed a significant increase in the marker in breast tumours (Figures 1A and 1B). This finding could suggest that, in gastric and lung carcinomas, the relative cellular content and/or the regulation of the activity of PK are sufficient to channel through glycolysis the increase in carbon skeletons supplied by an augmented expression of GAPDH. In this regard, it has been documented that the induction of glycolytic genes by glucose is specific for some genes and not all of those that are induced are activated to the same extent and with the same kinetics [13].

The glycolytic and mitochondrial proteome of the different mammalian cell types differ substantially, both in terms of the relative expression level of the expressed proteins and in the expression of cell-type-specific isoforms, reflecting the relative relevance of the two energy-production pathways and the variable energetic demands of each cell type. In this regard, we observed a variable tissue response in the expression of the structural hsp60 marker of the mitochondria as a result of carcinogenesis. This finding is consistent with the de-regulation by carcinogenesis of the cell-type-specific programmes that control mitochondrial biogenesis and function in different mammalian tissues [14–17]. In this regard, the relative cellular increase in hsp60 expression observed in breast, lung and oesophageal cancer could suggest an activation of the programme of mitochondrial proliferation in these tumours as an attempt to compensate for the restrained cellular production of ATP by oxidative phosphorylation. In contrast, the lack of increase of hsp60 observed in gastric adenocarcinomas (Figure 1A), as well as in kidney and colon cancer [5], suggests that, although the functional differentiation [14,18,19] of the organelle is affected, in these types of cancer, there is no activation of mitochondrial proliferation. As recently discussed, the reduction of bioenergetic, structural and genetic markers of mitochondria observed in rat [20] and human hepatocarcinomas [21] is a paradigm of repression of the mechanisms

that regulate mitochondrial proliferation in the liver. Altogether, it appears that carcinogenesis differentially affects the phenotype of mitochondria in a tissue-specific manner, except in prostate cancer. In any case, we suggest that the BEC index could provide a convenient tool for the diagnosis of cancer patients bearing breast, lung, gastric and oesophageal tumours. The usefulness of the bioenergetic signature as a clinical marker should be explored in the near future in these types of cancer.

The mechanism by which the expression of β -F₁-ATPase is repressed in human cancers is not known. The expression of β -F₁-ATPase mRNA in human tumours of the brain, colon, eye, kidney, liver, lung, lymph nodes, mammary gland, placenta, prostate, skin, testis and uterus is up-regulated ($P < 0.05$) when compared with the normal tissue, as assessed by virtual Northern blotting using publicly available databases [22]. These findings strongly suggest that the control of β -F₁-ATPase expression in cancer is exerted at the level of translation of its mRNA. Indeed, translational control of β -F₁-ATPase expression has been documented in the liver during development [23–25], in rat hepatomas [7] and in the tissue-specific expression of this protein in mammalian tissues [25]. The mechanisms that control β -F₁-ATPase mRNA translation in mammalian cells are complex [25–28]. However, repression of β -F₁-ATPase mRNA translation is associated with increased expression and/or activity of specific β -F₁-ATPase mRNA-binding proteins that are regulated during development [25], in a tissue-specific manner [25] and in oncogenesis [7]. The molecular identification of these binding proteins, as well as the factors that regulate their RNA-binding activity should be targets of future cancer investigations. Likewise, the finding that β -F₁-ATPase expression is repressed in most tumours suggests that further efforts are required to understand the mechanistic contribution of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in cancer progression.

We thank Dr E. Campo (IDIBAPS) for the invaluable help he provided us at initial stages of this work and Dr J. Satrustegui [CBMSO (Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa')] for critical review of the manuscript before submission. A.I. is the recipient of a pre-doctoral fellowship from Fondo de Investigaciones Sanitarias (Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain). M.M., G.S. and A.D.O. are the recipients of pre-doctoral fellowships from Plan de Formación de Personal Investigador (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain) and Programa Nacional de Formación de Profesorado (Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Spain) respectively. This work was supported by grants 01/0380 from Ministerio de Sanidad y Consumo and BMC2001-0710 from Ministerio de Ciencia y Tecnología to J.M.C. (Spain), 01/1519 from Ministerio de Sanidad y Consumo and AECC (Asociación Española Contra el Cáncer) to P.L.F. (Spain) and from the National Institutes of Health (GM60554) to J.C.R. (U.S.A.). The CBMSO receives an institutional grant from Fundación Ramón Areces, Spain.

REFERENCES

- Yoshida, M., Muneyuki, E. and Hisabori, T. (2001) ATP synthase: a marvellous rotary engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 669–677.
- Matsuyama, S., Xu, Q., Velours, J. and Reed, J. C. (1998) The mitochondrial F₀F₁-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol. Cell* **1**, 327–336.
- Harris, M. H., Vander Heiden, M. G., Kron, S. J. and Thompson, C. B. (2000) Role of oxidative phosphorylation in Bax toxicity. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3590–3596.
- Dey, R. and Moraes, C. T. (2000) Lack of oxidative phosphorylation and low mitochondrial membrane potential decrease susceptibility to apoptosis and do not modulate the protective effect of Bcl-x_L in osteosarcoma cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 7087–7094.
- Cuezva, J. M., Krajewska, M., López de Heredia, M., Krajewski, S., Santamaría, G., Kim, H., Zapata, J. M., Marusawa, H., Chamorro, M. and Reed, J. C. (2002) The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res.* **62**, 6674–6681.
- Warburg, O. (1930) *Metabolism of tumors*, Arnold Constable, London.
- López de Heredia, M., Izquierdo, J. M. and Cuezva, J. M. (2000) A conserved mechanism for controlling the translation of β -F₁-ATPase mRNA between the fetal liver and cancer cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 7430–7437.
- Ramaswamy, S. and Golub, T. R. (2002) DNA microarrays in clinical oncology. *J. Clin. Oncol.* **20**, 1932–1941.
- Petricoin, E. F., Zoon, K. C., Kohn, E. C., Barrett, J. C. and Liotta, L. A. (2002) Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 683–695.
- Wulfkühle, J. D., Liotta, L. A. and Petricoin, E. F. (2003) Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 267–275.
- Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S. and Golub, T. R. (2003) A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat. Genet.* **33**, 49–54.
- Liotta, L. A. and Kohn, E. C. (2003) Cancer's deadly signature. *Nat. Genet.* **33**, 10–11.
- Roche, E., Assimakopoulos-Jeannot, F., Witters, L. A., Perruchoud, B., Yaney, G., Corkey, B., Asfari, M. and Prentki, M. (1997) Induction by glucose of genes coding for glycolytic enzymes in a pancreatic β -cell line (INS-1). *J. Biol. Chem.* **272**, 3091–3098.
- Cuezva, J. M., Ostronoff, L. K., Ricart, J., López de Heredia, M., Di Liegro, C. M. and Izquierdo, J. M. (1997) Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 365–377.
- Garesse, R. and Vallejo, C. G. (2001) Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* **263**, 1–16.
- Scarpulla, R. C. (2002) Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1576**, 1–14.
- Scarpulla, R. C. (2002) Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* **286**, 81–89.
- Valcarce, C., Navarrete, R. M., Encabo, P., Loeches, E., Satrustegui, J. and Cuezva, J. M. (1988) Postnatal development of rat liver mitochondrial functions: the roles of protein synthesis and of adenine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **263**, 7767–7775.
- Luis, A. M., Izquierdo, J. M., Ostronoff, L. K., Salinas, M., Santarén, J. F. and Cuezva, J. M. (1993) Translational regulation of mitochondrial differentiation in neonatal rat liver: specific increase in the translational efficiency of the nuclear-encoded mitochondrial β -F₁-ATPase mRNA. *J. Biol. Chem.* **268**, 1868–1875.
- Lal, A., Lash, A. E., Altschul, S. F., Velculescu, V., Zhang, L., McLendon, R. E., Marra, M. A., Prange, C., Morin, P. J., Polyak, K. et al. (1999) A public database for gene expression in human cancers. *Cancer Res.* **59**, 5403–5407.
- Izquierdo, J. M., Ricart, J., Ostronoff, L. K., Egea, G. and Cuezva, J. M. (1995) Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of β -F₁-ATPase gene expression during mitochondrial biogenesis in liver. *J. Biol. Chem.* **270**, 10342–10350.
- Izquierdo, J. M. and Cuezva, J. M. (1997) Control of the translational efficiency of β -F₁-ATPase mRNA depends on the regulation of a protein that binds the 3' untranslated region of the mRNA. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5255–5268.
- Izquierdo, J. M. and Cuezva, J. M. (2000) Internal-ribosome-entry-site functional activity of the 3'-untranslated region of the mRNA for the β subunit of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Biochem. J.* **346**, 849–855.
- Di Liegro, C. M., Bellafiore, M., Izquierdo, J. M., Rantanen, A. and Cuezva, J. M. (2000) 3'-Untranslated regions of oxidative phosphorylation mRNAs function *in vivo* as enhancers of translation. *Biochem. J.* **352**, 109–115.
- Ricart, J., Izquierdo, J. M., Di Liegro, C. M. and Cuezva, J. M. (2002) The assembly of the ribonucleoprotein complex containing the mRNA of the β -subunit of the mitochondrial H⁺-ATP synthase requires the participation of two distal *cis*-acting elements and a complex set of cellular *trans*-acting proteins. *Biochem. J.* **365**, 417–428.

Received 7 October 2003/3 December 2003; accepted 19 December 2003

Published as BJ Immediate Publication 19 December 2003, DOI 10.1042/BJ20031541

Loss of the Mitochondrial Bioenergetic Capacity Underlies the Glucose Avidity of Carcinomas

Fernando López-Ríos,¹ María Sánchez-Aragó,² Elena García-García,¹ Álvaro D. Ortega,² José R. Berrendero,³ Francisco Pozo-Rodríguez,¹ Ángel López-Encuentra,¹ Claudio Ballestín,¹ and José M. Cuezva²

¹Hospital Universitario 12 de Octubre, CIBER de Enfermedades Respiratorias; ²Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CIBER de Enfermedades Raras, Universidad Autónoma de Madrid-Consejo Superior de Investigaciones Científicas; and ³Departamento de Matemáticas, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Abstract

The down-regulation of the catalytic subunit of the mitochondrial H⁺-ATP synthase (β-F1-ATPase) is a hallmark of most human carcinomas. This characteristic of the cancer cell provides a proteomic signature of cellular bioenergetics that can predict the prognosis of colon, lung, and breast cancer patients. Here we show that the *in vivo* tumor glucose uptake of lung carcinomas, as assessed by positron emission tomography in 110 patients using 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose as probe, inversely correlates with the bioenergetic signature determined by immunohistochemical analysis in tumor surgical specimens. Further, we show that inhibition of the activity of oxidative phosphorylation by incubation of cancer cells with oligomycin triggers a rapid increase in their rates of aerobic glycolysis. Moreover, we show that the cellular expression level of the β-F1-ATPase protein of mitochondrial oxidative phosphorylation inversely correlates ($P < 0.001$) with the rates of aerobic glycolysis in cancer cells. The results highlight the relevance of the alteration of the bioenergetic function of mitochondria for glucose capture and consumption by aerobic glycolysis in carcinomas. [Cancer Res 2007;67(19):9013–7]

Introduction

The cellular uptake of the nonmetabolizable 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose (FDG) used in positron emission tomography (PET) has emerged as a valuable tool for diagnosing and staging cancer patients (1). Tumor capture of FDG is expressed by the standardized uptake value (SUV), which provides an estimation of glucose consumption by tumor cells. The increased glucose capture of tumor cells could result from an augmented demand for carbon skeletons to sustain uncontrolled proliferation and/or from a shift in the pathway used for energy provision during cellular proliferation. The latter was suggested by Otto Warburg many years ago (2) but remained largely unexplored until the recent renaissance of the so-called “Warburg effect” in cancer biology (3).

It has been shown that most types of cancers (4–6) fit the Warburg hypothesis because a decreased expression of mitochon-

drial H⁺-ATP synthase (β-F1-ATPase), which is a bottleneck of mitochondrial oxidative phosphorylation, is linked to an increased expression of several markers of the glycolytic pathway (4, 5). This proteomic feature of cancer was defined as “the bioenergetic signature” and shown to provide a relevant marker of disease progression in colon, lung, and breast cancer patients (4–6). Moreover, it has been predicted that the bioenergetic signature further provides a marker of the cellular response to chemotherapy (7).

In this work, we show that glucose uptake of lung carcinomas, as assessed *in vivo* by FDG-PET imaging in the clinical setting, correlates with proteomic markers of the bioenergetic signature determined in surgical specimens. Moreover, we show that the rate of aerobic glycolysis in cancer cells depends on the activity of oxidative phosphorylation and on the expression level of markers of the bioenergetic signature. These results support, in part, that the increased glucose avidity of carcinomas results from a shift in the pathways of energy provision in the cancer cell and thus support Warburg’s hypothesis.

Materials and Methods

Patients. Surgical specimens, study procedures, and clinical information of patients with potentially respectable non-small-cell lung cancer were those described previously (8). A summary of relevant clinicopathologic information of the cohort of patients analyzed is provided in Table 1.

PET studies. PET examinations were done in 6-h-fasted patients using an ECAT EXACT 47 (Siemens-CTI) camera with whole-body attenuation (8). Patients entering the PET study had blood glucose concentrations <7 mmol/L. The transmission study (slices of 16.6-cm width) was done with a germanium-68 source during 20 min. After, the patient was injected an i.v. dose of 370 MBq of [¹⁸F]FDG. The emission study commenced 45 min after the injection and lasted for 20 min. Slices of 16.2-cm width were subsequently obtained with a 5-min exposition each and corrected for attenuation with a Sun Ultra 60 computer 2 × 450 MHz with an iterative reconstruction-type, attenuation-weighted ordered-subsets expectation maximization. Measurements were conducted consistently in each patient. Regions of interest were manually drawn on the transaxial images around the most intense focal [¹⁸F]FDG uptake zone in the primary tumor, and the maximum SUV (SUV_{max}) for each patient was used to minimize the partial volume effects. It should be noted that clinical decisions were blinded to PET results.

Immunohistochemistry. Tissue microarrays containing triplicate 1-mm cores from selected tumor areas of paraffin-embedded lung carcinomas were constructed. The primary antibodies used were anti-β-F1-ATPase (1:3,000; ref. 4), anti-Hsp60 (1:400; SPA 807, StressGen), anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH; 1:8,000), and anti-pyruvate kinase (1:2,000; both from Abcam). The expression level of the markers was scored as previously described (ref. 4; see also Fig. 1).

Note: M. Sánchez-Aragó and E. García-García contributed equally to this work. Present address for E. García-García: Laboratorio de Dianas Terapéuticas, Centro Integral Oncológico “Clara Campal,” 28050 Madrid, Spain.

Requests for reprints: José M. Cuezva, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain. Phone: 34-91-497-4866; Fax: 34-91-497-4799; E-mail: jmcuezva@cbm.uam.es.

©2007 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1678

Table 1. Summary of clinicopathologic characteristics of the cohort of patients studied

Characteristics	
Age, y	
Range	43-82
Mean	65
Gender, <i>n</i> (%)	
Male	104 (96)
Female	6 (4)
Histology, <i>n</i> (%)	
SCC	63 (57)
AC	26 (24)
Others	21 (19)
T stage, <i>n</i> (%)	
T ₁	25 (23)
T ₂	65 (59)
T ₃	12 (11)
T ₄	8 (7)
N stage, <i>n</i> (%)	
N ₀	65 (59)
N ₁	17 (15)
N ₂	23 (21)
N ₃	5 (5)
M stage, <i>n</i> (%)	
M ₀	93 (85)
M ₁	17 (15)
SUV _{max} , <i>n</i> (%)	
≤5.0	40 (36)
>5.0	68 (62)
Unknown	2 (2)

Abbreviations: SCC, squamous cell carcinoma; AC, adenocarcinoma.

Cell cultures. Human liver (HepG2), lung (HOP62), and colon (KM12 and HCT116) cancer cells were grown. To change the bioenergetic phenotype of HCT116 cells (9), cells were incubated with 6 μ mol/L oligomycin or 10 mmol/L 2-deoxyglucose for 2 days. The antibodies used for Western blotting were anti- β -F1-ATPase (1:20,000), anti-Hsp60 (1:2,000), anti-GADPH (1:20,000), and anti-pyruvate kinase (1:1,000). For the determination of aerobic glycolysis, cells were incubated with or without 6 μ mol/L oligomycin to assess the relevance of oxidative phosphorylation in the rates of aerobic glycolysis. At various times, 0.1-mL aliquots of the culture media were collected and used for the enzymatic determination of lactate (10).

Statistical analysis. Pearson's and Spearman's coefficients were used for linear correlation studies. Simple and multiple linear regression models were fitted to the data. Response variables were SUV_{max} and SUV normalized for the tumor size (TSN-SUV). Explanatory variables were the expression levels of mitochondrial and glycolytic markers. In all cases, the global significance of the models and the individual significance of each explanatory variable were assessed using standard *F* test and Student's *t* test. One-way ANOVA was used to detect differences in SUV_{max} for different levels of β -F1-ATPase/GAPDH ratio in the tumors. Standard *F* tests were used to assess significance. To determine the degree of association of SUV_{max} and β -F1-ATPase expression with survival, the mean values of both variables were used as cutoff points to define potentially "high-risk" and "low-risk" groups. Survival curves were computed using Kaplan-Meier estimates and compared using the log-rank test. Cox proportional hazards regression methods were used for multivariate survival analysis.

Results

A set of 110 lung carcinomas with full clinical annotation including PET data were studied (Table 1; ref. 8). Tissue sections were reviewed by two pathologists to reclassify lung tumors according to the 2004 WHO Classification and processed for immunohistochemical analysis of mitochondrial (β -F1-ATPase and Hsp60) and glycolytic (GAPDH and pyruvate kinase) markers of the bioenergetic signature of the cell (Fig. 1; refs. 4, 5). The FDG uptake of the tumor assessed by the SUV_{max} was also normalized for the tumor size (TSN-SUV) to obtain an estimation of the avidity for glucose per tumor unit, using the largest diameter (in centimeters) of the surgical specimen as determined by the pathologist.

We observed that in our cohort of patients, a lower SUV_{max} of the tumor was a significant prognostic factor of survival (Fig. 2A), consistent with recent findings (11). A direct linear correlation was observed between tumor SUV_{max} data and the expression level of GAPDH ($R = 0.196$, $P = 0.044$), suggesting that glucose capture by the tumor is linked to its rate of utilization

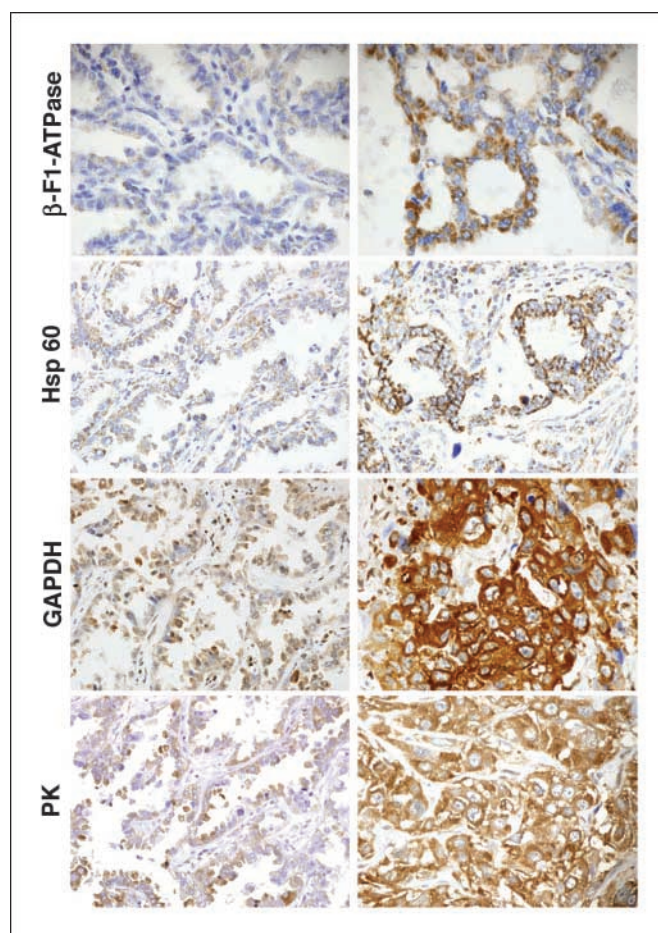
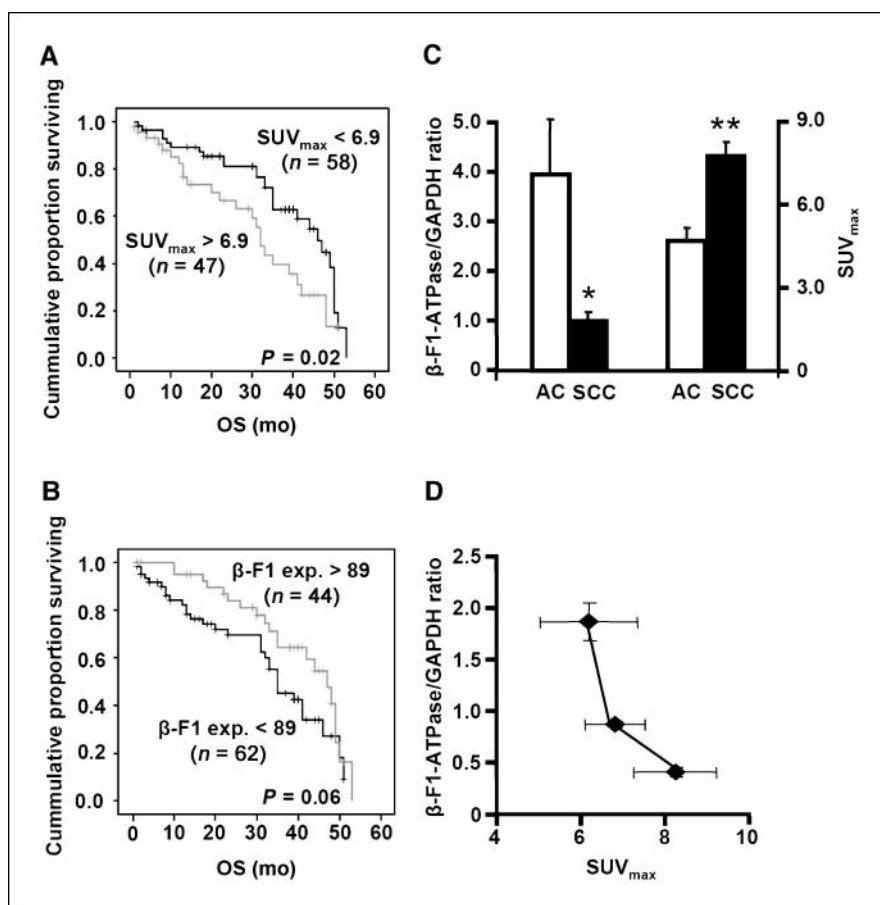


Figure 1. Expression of markers of the bioenergetic signature in lung carcinomas. Tissue microarray sections were cut and processed for immunohistochemical analysis of the markers of the bioenergetic signature. Representative examples of low (left) and high (right) expression levels of the mitochondrial β -F1-ATPase and Hsp60 as well as of the glycolytic GAPDH and pyruvate kinase (PK) markers. Note the preferential granular perinuclear staining of the cytoplasm revealing mitochondria in β -F1-ATPase and Hsp60 and the diffuse staining of the cytoplasm in GAPDH and pyruvate kinase.

Figure 2. Tumor glucose uptake and the bioenergetic signature of non-small-cell lung cancer. **A** and **B**, Kaplan-Meier survival analysis shows the association of FDG uptake (SUV_{max}) and β -F1-ATPase expression in lung cancer with patients' overall survival (OS), respectively. **C**, the bioenergetic signature (β -F1-ATPase/GAPDH ratio) and FDG uptake (SUV_{max}) of adenocarcinomas (AC) and squamous cell carcinomas (SCC) of the lung. **Columns**, mean of 26 and 63 tumors for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, respectively; **bars**, SE. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, compared with adenocarcinoma. **D**, the bioenergetic signature of lung carcinomas defines the rates of glucose uptake (SUV_{max}) as assessed by FDG-PET. **Points**, mean of 33/32, 38/37, and 37/37 tumors for β -F1-ATPase/GAPDH ratio and SUV_{max} data, respectively; **bars**, SE. The relationship between the two variables is significant ($P = 0.048$) as assessed by standard F test in a one-way ANOVA model.



by glycolysis. Although no correlation was observed between tumor SUV_{max} data and pyruvate kinase expression, both glycolytic markers (pyruvate kinase and GAPDH) significantly correlated in the surgical specimens ($R = 0.368$, $P < 0.001$), supporting a concerted adaptation of lung tumors to a glycolytic phenotype (4, 5). A significant inverse correlation was found between TSN- SUV values and the expression level of β -F1-ATPase in the tumors ($R = -0.308$, $P = 0.004$). In contrast with this finding, no correlation was observed between the expression of Hsp60, a structural marker of mitochondria, and SUV_{max} or TSN- SUV data, suggesting that the loss of the bioenergetic marker of mitochondria underlies the increased glucose uptake of the cancer cell. Multiple regression analysis supports that tumor size ($P = 0.001$) and β -F1-ATPase expression ($P = 0.007$) are independent explanatory variables for TSN- SUV . These linear correlations also hold when patients with advanced disease were excluded from the analysis. In agreement with previous findings (6), it was found that patients with a higher tumor expression level of β -F1-ATPase had a higher life expectancy (Fig. 2B), whereas other markers provided no meaningful correlations with survival. Moreover, multivariate Cox regression analysis indicated that β -F1-ATPase expression ($P = 0.044$), SUV_{max} ($P = 0.020$), and tumor stage ($P = 0.010$) are independent markers of survival, although these correlations did not reach the level of significance when applied to the cohort of patients that underwent surgery, most likely because of the reduction in the number of cases.

The β -F1-ATPase/GAPDH ratio is a proteomic index of the overall mitochondrial capacity of the cell (4–6). It was found that squamous cell carcinomas displayed a lower β -F1-ATPase/GAPDH ratio than lung adenocarcinomas (Fig. 2C) and had significantly higher SUV_{max} values (Fig. 2C). Moreover, the stratification of lung carcinomas based on the overall mitochondrial capacity of the cell also significantly related ($P = 0.048$) with the rates of glucose consumption as assessed by FDG capture (Fig. 2D).

To illustrate the relevance of oxidative phosphorylation in the rate of glucose consumption by aerobic glycolysis, various human cancer cell lines were treated with oligomycin, an inhibitor of H⁺-ATP synthase. Oligomycin treatment promoted a rapid burst in glucose consumption in the cells as assessed by the rapid increase in their rates of aerobic glycolysis (Fig. 3A). Likewise, the regulation of the overall mitochondrial activity of HCT116 cells (9), which results in cells expressing different levels of β -F1-ATPase (Fig. 3B), also showed a significant inverse relationship ($P < 0.001$) between the rate of glucose consumption by aerobic glycolysis and the mitochondrial capacity of the cell (Fig. 3B). Taken together, these results highlight both *in vivo* and *in vitro* the relevance of the bioenergetic function of mitochondria for cellular glucose uptake and consumption.

Discussion

The onset of the Warburg effect in the cancer cell (i.e., the shift to a glycolytic phenotype) has been explained on the grounds of

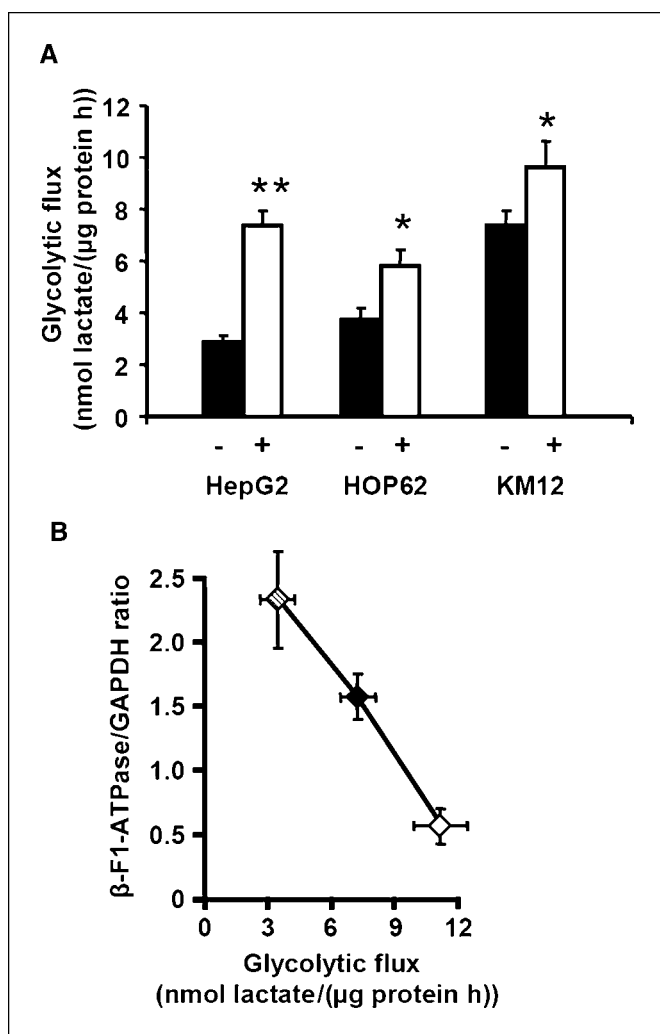


Figure 3. The activity of oxidative phosphorylation and the bioenergetic signature of the cell define the rate of glucose consumption by aerobic glycolysis. **A**, the flux of aerobic glycolysis of cancer cells (HepG2, HOP62, and KM12) increases when the activity of the mitochondrial H^+ -ATPase is inhibited by incubation of the cells with oligomycin (+). Columns, mean of three to six determinations; bars, SE. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$, compared with nontreated (–) cells. **B**, the bioenergetic signature (β -F1-ATPase/GAPDH ratio) of HCT116 cells defines the rates of glucose utilization by aerobic glycolysis. HCT116 cells were incubated with 10 mmol/L 2-deoxyglucose (hatched symbol) or 6 μ mol/L oligomycin (open symbol), or left untreated (closed symbol), for 48 h to promote changes in the cellular bioenergetic phenotype. After removal of the drugs, the cells were maintained in culture for the determination of the bioenergetic signature and rates of glycolysis. Points, mean of 4 (hatched), 9 (closed), and 5 (open) independent determinations for β -F1-ATPase/GAPDH ratio and of 6 (hatched), 15 (closed), and 8 (open) determinations for glycolytic flux; bars, SE. The relationship between the two variables is highly significant ($P < 0.001$) as assessed by standard F test in a one-way ANOVA model.

(a) metabolic adaptation to the hypoxic environment where the tumor develops (12) and/or by a direct effect of hypoxia-inducible factor 1 α on mitochondrial bioenergetics (13); (b) mutations in oncogenes and proteins related to signal transduction pathways (myc, Akt, and mTOR) that, in turn, promote changes in the expression of genes involved in cellular energetic metabolism (10, 14) or directly interfere with mitochondrial bioenergetics by affecting the biogenesis of specific respiratory complexes (15); and finally, (c) by mutations in mitochondrial DNA (16) or in nuclear genes involved in the metabolic and bioenergetic function of the organelle (17). However, superimposed to any of these genetic and/or epigenetic alterations, it is possible that the shift to a glycolytic phenotype is hardwired in cancer cells because glycolysis is the metabolic pathway required for cellular proliferation. In fact, it has been described that lymphocytes shift to glycolysis during cellular proliferation (18). Moreover, progression through the cell cycle is supported by nonrespiratory modes of energy generation as a result of the inhibition of mitochondrial function by cyclin D1 (19). In this regard, the late cell cycle biosynthesis of β -F1-ATPase, which mostly occurs at G₂-M by a mechanism that requires the internal ribosome entry site translational activity of the 3' untranslated region of the transcript (20), could suggest that differences in the bioenergetic signature of tumor specimens might also arise as a result of diverse rates of cellular proliferation in the tumor.

Overall, we provide for the first time a link between the expression of a mitochondrial protein involved in energy transduction (β -F1-ATPase) and the functional estimation of the rate of glucose capture and consumption in cancer cells. The results support that an altered oxidative phosphorylation is one of the determinants that underlies the abnormal aerobic glycolysis of the cancer cell, sustaining Warburg's hypothesis and affording a mechanistic explanation for FDG-PET imaging in oncology.

Acknowledgments

Received 5/11/2007; revised 7/20/2007; accepted 8/13/2007.

Grant support: Ministerios de Sanidad (PI041255) y Educación y Ciencia (SAF05-4001, BFU07-65253), Comunidad de Madrid (S-GEN-0269), Fina Biotech S.L., Fundación Investigación Biomédica Hospital Universitario 12 de Octubre, and Fundación Mutua Madrileña.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank J. Satrustegui for comments on this work.

References

- Rigo P, Paulus P, Kaschten BJ, et al. Oncological applications of positron emission tomography with fluorine-18 fluorodeoxyglucose. *Eur J Nucl Med* 1996; 23:1641–74.
- Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956;124:269–70.
- Garber K. Energy deregulation: licensing tumors to grow. *Science* 2006;312:1158–9.
- Cuezva JM, Krajewska M, de Heredia ML, et al. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 2002;62:6674–81.
- Isidoro A, Casado E, Redondo A, et al. Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* 2005;26:2095–104.
- Cuezva JM, Chen G, Alonso AM, et al. The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis* 2004;25:1157–63.
- Shin YK, Yoo BC, Chang HJ, et al. Down-regulation of mitochondrial F1F0-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance. *Cancer Res* 2005;65:3162–70.
- Pozo-Rodriguez F, Martin de Nicolas JL, Sanchez-Nistal MA, et al. Accuracy of helical computed tomography and [¹⁸F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography for identifying lymph node mediastinal metastases in potentially resectable non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:8348–56.
- Rosignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy substrate modulates

- mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:985–93.
10. Govindarajan B, Sligh JE, Vincent BJ, et al. Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. *J Clin Invest* 2007;117:719–29.
11. Sasaki R, Komaki R, Macapinlac H, et al. [¹⁸F]Fluorodeoxyglucose uptake by positron emission tomography predicts outcome of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:1136–43.
12. Semenza GL, Artemov D, Bedi A, et al. “The metabolism of tumours”: 70 years later. *Novartis Found Symp* 2001;240:251–60.
13. Kim JW, Dang CV. Cancer’s molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res* 2006;66:8927–30.
14. Osthus RC, Shim H, Kim S, et al. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* 2000;275:21797–800.
15. Matoba S, Kang JG, Patino WD, et al. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 2006;312:1650–3.
16. Polyak K, Li Y, Zhu H, et al. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet* 1998;20:291–3.
17. Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, et al. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 2000;287:848–51.
18. Wang T, Marquardt C, Foker J. Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation. *Nature* 1976;261:702–5.
19. Sakamaki T, Casimiro MC, Ju X, et al. Cyclin d1 determines mitochondrial function *in vivo*. *Mol Cell Biol* 2006;26:5449–69.
20. Martinez-Diez M, Santamaria G, Ortega AD, Cuezva JM. Biogenesis and dynamics of mitochondria during the cell cycle: significance of 3’UTRs. *PLoS ONE* 2006;1:e107.

A message emerging from development: the repression of mitochondrial β -F1-ATPase expression in cancer

José M. Cuezva · María Sánchez-Aragó · Sandra Sala ·
Amaya Blanco-Rivero · Álvaro D. Ortega

Published online: 22 August 2007
© Springer Science + Business Media, LLC 2007

Abstract Mitochondrial research has experienced a considerable boost during the last decade because organelle malfunctioning is in the genesis and/or progression of a vast array of human pathologies including cancer. The renaissance of mitochondria in the cancer field has been promoted by two main facts: (1) the molecular and functional integration of mitochondrial bioenergetics with the execution of cell death and (2) the implementation of ^{18}F FDG-PET for imaging and staging of tumors in clinical practice. The latter, represents the *bed-side* translational development of the metabolic hallmark that describes the bioenergetic phenotype of most cancer cells as originally predicted at the beginning of previous century by Otto Warburg. In this minireview we will briefly summarize how the study of energy metabolism during liver development forced our encounter with Warburg's postulates and prompted us to study the mechanisms that regulate the biogenesis of mitochondria in the cancer cell.

Keywords Mitochondria · H^+ -ATP synthase · Oxidative phosphorylation · Glycolysis · Cancer

Introduction

Mitochondria play essential roles in cellular energetic metabolism (Ortega and Cuezva 2005), the execution of cell death (Wang 2001; Jaattela 2004) and intracellular

calcium (Satrústegui et al. 2006) and reactive oxygen species (Brunelle et al. 2005; Kaelin 2005) signaling. Therefore, a growing number of human diseases are now associated with molecular and/or functional alterations in mitochondria (DiMauro and Schon 2001; Cuezva et al. 2002; Wallace 2005; Lin and Beal 2006). Mitochondria are highly dynamic organelles whose morphological changes are linked to their functionality (Rojo et al. 1998; Okamoto and Shaw 2005; Santamaria et al. 2006; Martínez-Diez et al. 2006). Contrary to a general belief, the different cell types of mammals are endowed with mitochondria that differ significantly in their molecular composition (Mootha et al. 2003). Qualitative and quantitative changes in the ultrastructure, number and function of mitochondria are more evident during development of a given tissue (Valcarce et al. 1988; Izquierdo et al. 1995a,b). In this regard, the study of the cellular and molecular biology of mitochondria in different cell types of mammals, especially in the non-canonical tissues, is urgently required in order to characterize the molecular basis underlying the specific alterations of the mitochondrial proteome observed in different human cancers.

Discussion

The Pasteur Effect in the liver during development

Otto Warburg (1930, 1956a,b) first suggested that the high aerobic glycolysis observed in most tumors should result from an impaired bioenergetic function of the mitochondria of the cancer cell. Warburg's formulation was based on the principles of the Pasteur Effect that, in today's terminology (Lehninger 1970), basically states that the metabolic flux of glycolysis in aerobic cells depends on the energy provided

J. M. Cuezva (✉) · M. Sánchez-Aragó · S. Sala ·
A. Blanco-Rivero · Á. D. Ortega
Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología
Molecular "Severo Ochoa", Centro de Investigación
Biomédica en Red de Enfermedades Raras,
Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain
e-mail: jmcuezva@cbm.uam.es

in the form of ATP by mitochondrial oxidative phosphorylation. That is, if there is a limitation in the oxygen availability to the cell, or such a cell has a genetic or epigenetic alteration that impairs normal functioning of oxidative phosphorylation, the flux of glycolysis should be increased in order to cope with the cellular energetic demand. Adjustment of the flux of glycolysis could be exerted at short-term by allosteric regulation of key enzymes of the glycolytic pathway and, at long-term, by adjusting the phenotype of the cell through changes in the expression of the enzymes involved in energy generation pathways. This concept of metabolic regulation has been illustrated in textbooks of Biochemistry for many years. Nowadays, however, it has faded or disappeared from some perhaps for the same reason Warburg's hypothesis was neglected (Warburg 1966; Krebs 1981) or considered as an epiphenomenon of cancer until recently (Garber 2004, 2006).

A beautiful example of the operation of the Pasteur Effect is provided by the rapid shift in the relevance of cellular energy provision pathways (glycolysis versus oxidative phosphorylation) of the hepatocytes at the time of mammalian birth (reviewed in Cuezva et al. 1997) (Fig. 1a). During fetal development the hepatocytes derives most of its energy requirements from glycolysis producing large amounts of lactate (Fig. 1a). However, soon after birth, the increased availability of oxygen (Fig. 1a) triggers a sharp reduction in the rates of glucose consumption. Therefore, the rates of lactate produced by the neonatal hepatocyte are sharply diminished (Fig. 1a) (Mayor and Cuezva 1985;

Cuezva et al. 1997). The repression of lactate production rates in the neonatal hepatocyte (Fig. 1b) is due to the onset of mitochondrial function and the proliferation of mitochondria (Valcarce et al. 1988; Izquierdo et al. 1995a,b; Cuezva et al. 1997). This example of the switch from glycolysis to oxidative phosphorylation is phenotypically expressed by sharp inverse changes in the relative expression level of the enzymes involved in the energy provision pathways of the liver (Fig. 1b) (Cuezva et al. 1997).

Post-transcriptional regulation of the biogenesis of mitochondria in mammalian liver

The establishment of mitochondrial function in the neonatal liver soon after birth is an active process of mitochondrial biogenesis that requires the coordinated expression of the two genetic systems that encode mitochondrial proteins (Valcarce et al. 1988; Izquierdo et al. 1990, 1995b; Luis et al. 1993). This process represents the rapid (less than 1 h) bioenergetic transformation of pre-existing fetal mitochondria into fully functional organelles (Valcarce et al. 1988, 1990; Valcarce and Cuezva 1991). In contrast with other metabolic pathways that are induced at the same stage of development, the regulation of the expression of both the nuclear and mitochondrial genomes is controlled at the post-transcriptional levels (Izquierdo et al. 1990, 1995b; Luis et al. 1993; Ostronoff et al. 1995, 1996). In particular, the mRNAs encoding proteins involved in oxidative phosphorylation accumulated in the fetal liver as a result of developmental changes in the half-life of the corresponding

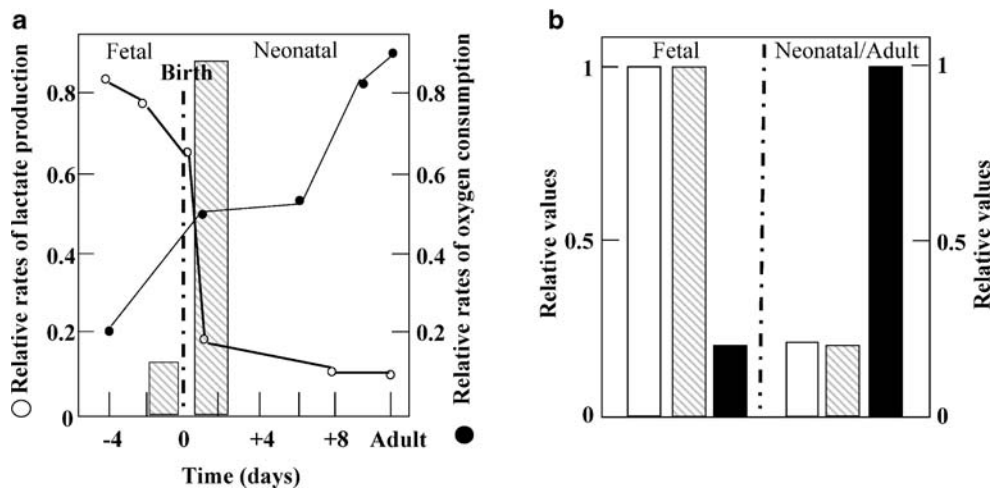


Fig. 1 The Pasteur Effect during development of the rat liver. **a** Birth triggers a profound ten-fold increase in blood oxygen concentrations in the neonatal rat (hatched bars). The rates of aerobic glycolysis (open circles) are sharply diminished after birth (discontinuous line) as a result of the onset of mitochondrial biogenesis in the neonatal hepatocyte. Changes in oxygen consumption rates of the hepatocytes

as development of the liver proceeds are also indicated (closed circles). **b** Shows the rapid and profound changes in the *in vivo* estimated lactate turnover rates (open bars) and the expression level of glycolytic enzymes (hatched bars) and mitochondrial β -F1-ATPase protein (closed bars) per unit of liver during development of the rat

mRNAs (Fig. 2a) (Izquierdo et al. 1995a,b; Ostronoff et al. 1995). However, these accumulated mRNAs are masked, that is, in a translation-repressed state until the time of birth where they become preferential substrates of both the cytosolic and mitochondrial translation machineries (Luis et al. 1993; Izquierdo et al. 1995b; Ostronoff et al. 1996). In the specific case of the mRNA that encodes the catalytic subunit of the H^+ -ATP synthase (β -F1-ATPase mRNA), a specific subcellular structure of the hepatocyte controls the localization and cytoplasmic expression of the mRNA (Egea et al. 1997; Ricart et al. 1997, 2002; Lithgow et al. 1997). Overall, these results illustrated, for the first time in the field of mammalian mitochondrial biogenesis, that processes that control the localization, stability and translation of oxidative phosphorylation genes are relevant for understanding mitochondrial biogenesis during development (Izquierdo et al. 1995b), in cellular proliferation (Martínez-Díez et al. 2006) and in oncogenesis (López de Heredia et al. 2000; Cuezva et al. 2002, 2004; Isidoro et al. 2004, 2005).

Translational repression of the biogenesis of mitochondria in the cancer cell

Large biochemical similarities exist between tumors and fetal/embryonic tissues. In fact, these similarities (reviewed in Cuezva et al. 1997) led us to study the mechanisms that regulate the biogenesis of mitochondria and the expression of β -F1-ATPase in rat hepatomas (López de Heredia et al. 2000). We found that mitochondrial biogenesis in hepatomas is repressed when compared to the normal adult liver. The inhibition of β -F1-ATPase expression in As30D and FAO (López de Heredia et al. 2000) as well as in Zadjela (Luciakova and Kuzela 1992) hepatomas occurs in the paradoxical situation of an increase abundance of β -F1-ATPase mRNA (β -mRNA) (Fig. 2a). Interestingly, the accumulation of oxidative phosphorylation (OXPHOS) transcripts in the hepatomas resulted from an increased stability as compared to the half-life of the transcripts in normal liver (Fig. 2a) (López de Heredia et al. 2000), very much resembling the situation of OXPHOS mRNAs in the

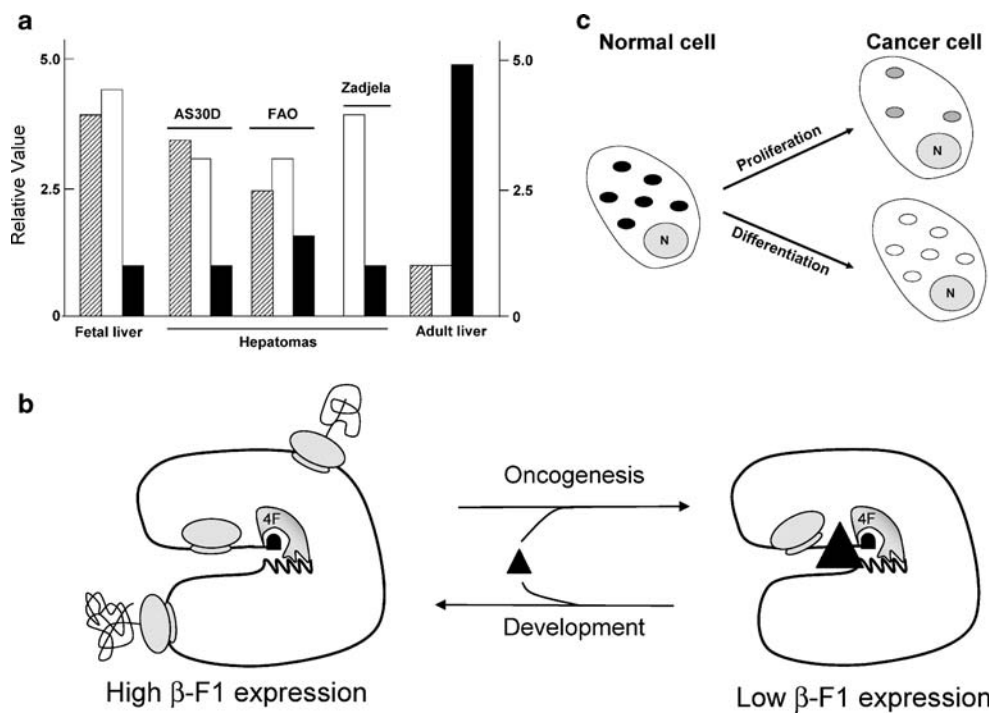


Fig. 2 Repression of β -F1-ATPase expression in the cancer cell. **a** Shows the relative values of β -F1-ATPase mRNA turnover (hatched bars), mRNA expression (open bars) and β -F1-ATPase protein (closed bars) assessed at different stages of liver development of the rat and in three rat hepatomas (AS30D, FAO, Zadjela). **b** The diagram illustrates two states (High and Low Efficiency) of the translation of β -F1-ATPase mRNA (black line). High β -F1 expression is achieved when there is no activity of proteins that bind the 3'UTR of the mRNA (Neonatal/Adult liver). Low β -F1 expression (Fetal liver/Hepatomas) results from the binding of β -mRNABPs (closed

triangles) to the 3'UTR of the mRNA, hampering in this way the efficient initiation of translation of the mRNA. The translation of β -F1-ATPase mRNA is depicted on a circular molecule due to the physical cross-talk of both mRNA ends exerted by the scaffold provided by translation initiation complex eIF4F. Ribosomes and nascent polypeptides are also represented. **c** The alteration of mitochondrial phenotype of the cancer cell could result from interference in the program of organelle proliferation and/or differentiation, in both cases the BEC index is reduced

fetal liver (Fig. 2a) (Izquierdo et al. 1995a,b; Ostronoff et al. 1995). This further suggested the occurrence of a translational masking event of OXPHOS mRNAs in the cancer cell. Indeed, extracts from rat hepatomas (López de Heredia et al. 2000), as well as from fetal livers (Izquierdo and Cuezva 1997), exerted a strong and specific inhibition of the synthesis of the precursor protein of β -F1-ATPase in *in vitro* assays. Mechanistically, regulation of β -mRNA translation is explained by differences in the affinity of the mRNA for the components of the translational machinery, as well as by the action of specific proteins that bind regulatory elements within the mRNA preventing their essential role in translation (Fig. 2b) (Izquierdo and Cuezva 1997; López de Heredia et al. 2000; Ricart et al. 2002). In this regard, the 3'UTR of β -mRNA is essential for efficient translation of the mRNA due to its ability to interact preferentially with components of the translational machinery (Izquierdo and Cuezva 1997). In fact, the 3'UTR of β -mRNA is endowed with an activity comparable to RNA sites that promote internal initiation of translation (IRES) (Fig. 2b) (Izquierdo and Cuezva 2000), an activity that is present in certain RNA sequence elements found in some viral and cellular RNAs (Pelletier and Sonenberg 1988; Johannes and Sarnow 1998). That is, functionally the 3'UTR of β -mRNA behaves as a translational enhancer both *in vitro* (Izquierdo and Cuezva 1997, 2000) and *in vivo* (Di Liegro et al. 2000). Besides, the control of translation of β -mRNA during liver development (Izquierdo and Cuezva 1997) and in cancer cells (López de Heredia et al. 2000) has also features in common with other systems. In particular, fetal liver (Izquierdo and Cuezva 1997; Ricart et al. 2002) and cancer cells (López de Heredia et al. 2000) contain a set of proteins that specifically bind the 3'UTR of the mRNA (Fig. 2b). This binding might sterically hinder ribosome recruitment and the initiation of translation leading to a decreased expression of β F1-ATPase both during fetal development and in liver carcinogenesis (Fig. 2b). Interestingly, the RNA binding activity of these proteins, which display poly A binding specificity (Izquierdo and Cuezva 2005), is regulated by changes in the cellular redox and energy states (Izquierdo and Cuezva 2005).

Alteration of the mitochondrial proteome in human tumors: the Bioenergetic Signature of Cancer

The glycolytic phenotype of human tumors has been widely demonstrated at the biochemical, molecular and functional levels (Semenza et al. 2001; Ziegler et al. 2001; Sasaki et al. 2005). However, the alteration of the bioenergetic function of mitochondria in the cancer cell (for a detailed review see Pedersen 1978) within the context of the original Warburg hypothesis was not formally addressed until recently (Cuezva et al. 2002, 2004; Isidoro et al. 2004,

2005). For this purpose, we studied in normal and tumor biopsies derived from the same patients the changes in the expression level of bioenergetic (β F1-ATPase) and structural (hsp60) mitochondrial proteins concurrently with the expression of glycolytic (GAPDH, PK, LDH, HK) markers of the cell. This basic immunological approach allows a proteomic estimation of both the bioenergetic competence of the organelle (as assessed by the β F1/hsp60 ratio) and of the overall mitochondrial potential of the cell (β F1/hsp60/GAPDH ratio), the two factors that could define the cellular bioenergetic activity of mitochondria. The latter ratio was defined as the Bioenergetic Cellular Index (BEC index) (Cuezva et al. 2002). The results obtained strongly supported the original Warburg's hypothesis since it was observed that in most human carcinomas there was a reduction of the bioenergetic competence of the organelle (drop in the β F1/hsp60 ratio) concurrent with the up-regulation of glycolytic (GAPDH) markers. This results in a sharp reduction of the BEC index of the tumor when compared to the normal tissue (Cuezva et al. 2002, 2004; Isidoro et al. 2004, 2005). These findings have been confirmed and extended to other carcinomas (Unwin et al. 2003; Meierhofer et al. 2004; Yin et al. 2004; Hervouet et al. 2005; He et al. 2004; Mazzanti et al. 2006). In fact, almost all tumor samples analyzed within each type of neoplasia showed the alteration of the BEC index, further providing a marker of diagnostic applicability with a sensitivity >97% (Cuezva et al. 2004; Isidoro et al. 2005). These are the main reasons why the down-regulation of the BEC index of the tumors has been named the *Bioenergetic Signature of Cancer*.

The existence of a common feature to most types of carcinomas led us to consider the bioenergetic signature as a tool for the diagnosis and prognosis of cancer patients. Indeed, we should emphasize that the Bioenergetic Signature of Cancer significantly correlates with the survival of colon (Cuezva et al. 2002), lung (Cuezva et al. 2004), and breast (Isidoro et al. 2005) cancer patients, strongly suggesting the implication of mitochondria in cancer progression. Furthermore, the bioenergetic signature of the tumors has been further suggested to provide a predictive marker of the response of the tumor to chemotherapy (Shin et al. 2005) and for the design of future strategies in cancer treatment (Santamaria et al. 2006; Tomiyama et al. 2006).

Several interpretations have been provided aimed at explaining the Warburg effect in tumors (Osthus et al. 2000; Semenza et al. 2001; Cuezva et al. 2002; Govindarajan et al. 2005; Garber 2006; Matoba et al. 2006). Some authors suggest that the shift to a glycolytic phenotype results from tumor adaptation to the hypoxic environment where the tumor develops (Semenza et al. 2001). Others support that it results from mutations in oncogenes and proteins related to signal transduction pathways (myc, Akt, mTOR) that in

turn promote changes in the expression of genes involved in cellular energetic metabolism (Osthus et al. 2000; Rathmell et al. 2003; Schieke et al. 2006; Bensaad et al. 2006). More recently, a direct effect of HIF1 α (Selak et al. 2005; Papandreou et al. 2006; Kim et al. 2006; Kim and Dang 2006) and p53 (Matoba et al. 2006) activities has been suggested to impair mitochondrial bioenergetics. Likewise, other studies have described the occurrence of mutations on mtDNA (Polyak et al. 1998; Fliss et al. 2000; Carew and Huang 2002; Tan et al. 2002) or in nuclear genes involved in the metabolic and bioenergetic function of the organelle (Baysal et al. 2000; Habano et al. 2003; Neumann et al. 2004). Regardless of the ultimate genetic and/or epigenetic cause that could explain the Warburg phenotype of the cancer cell we think that translational control of the expression of β -mRNA is a mechanism that contributes to the alteration of the bioenergetic phenotype of human tumors (see Fig. 2b), as was the case in the rat liver during development (Luis et al. 1993; Izquierdo and Cuezva 1997) and in rat hepatomas (López de Heredia et al. 2000). In fact, both virtual (Lal et al. 1999) and real estimation (<http://www.oncomine.org>) of the relative cellular expression level of β -mRNA reveals that the transcript is paradoxically up-regulated in most human carcinomas when compared to the expression found in normal tissues. Therefore, the characterization of the molecular and cellular biology of β -mRNA in different human cell types is a prerequisite in order to understand the altered mitochondrial phenotype of human tumors. In fact, carcinogenesis causes at least two different alterations of the mitochondrial phenotype in the human cancer cell (Fig. 2c) (Cuezva et al. 2002). In liver cells, carcinogenesis involves a depletion of the organelles most likely because the mechanisms that control mitochondrial proliferation are affected (Fig. 2c) (Cuezva et al. 2002). In contrast, in colon, lung and perhaps in other tissues, carcinogenesis specifically affects the expression of β -F1-ATPase suggesting alterations in the mechanisms that control mitochondrial differentiation (Fig. 2c) (Cuezva et al. 2002). Obviously, we cannot exclude the possibility that the decreased expression of β -F1-ATPase observed in cancers could also result from the establishment of an exacerbated degradation of the protein in the cancer cell.

H⁺-ATP synthase, cell death and cancer

Increased and decreased cellular mitochondrial activities are respectively associated with suppression (Schulz et al. 2006) and development (Thierbach et al. 2005) of cancer. Moreover, the execution of cell death also requires efficient oxidative phosphorylation (Dey and Moraes 2000; Park et al. 2004; Kim et al. 2002; Tomiyama et al. 2006), with the molecular components of the H⁺-ATP synthase being

specifically required (Matsuyama et al. 1998, 2000; Gross et al. 2000; Harris et al. 2000). In fact, the H⁺-ATP synthase is necessary for the efficient execution of apoptosis (Santamaria et al. 2006) in cells that have a high dependence on oxidative phosphorylation for metabolic energy, thus providing another evidence linking metabolism to cell death (Plas and Thompson 2002; Danial et al. 2003; Azoulay-Zohar et al. 2004; Vahsen et al. 2004). The role of the H⁺-ATP synthase in the execution of cell death is mediated by controlling the generation of reactive oxygen species. This in turn promotes severe oxidative damage on cellular and mitochondrial proteins, favoring in this way the release of apoptogenic molecules from the organelle (Santamaria et al. 2006). In contrast, highly glycolytic cells, with scarce or no dependence on oxidative phosphorylation for energy provision, do not produce reactive oxygen species after a toxic insult and are resistant to mitochondria-gated cell death stimuli (Santamaria et al. 2006). These findings have led us to suggest that repression of the bioenergetic function of mitochondria is a hallmark strategy of the tumor cell in order to ensure its perpetuation.

Acknowledgements We thank Margarita Chamorro and Piedad Calvo and other past and present colleagues in our lab for their contributions and encouraging discussions in the subject of this review. This review article was written while the research activity in the authors' laboratory was supported by grants from the Ministerio de Sanidad (PI041255), Educación y Ciencia (SAF2005-4001) and Fundación Mutua Madrileña. The CBMSO is the recipient of an institutional grant from Fundación Ramón Areces.

References

- Azoulay-Zohar H, Israelson A, Abu-Hamad S, Shoshan-Barmatz V (2004) *Biochem J* 377:347–355
- Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch A, van der Mey A, Taschner PE, Rubinstein WS, Myers EN, Richard CW III, Cornelisse CJ, Devilee P, Devlin B (2000) *Science* 287:848–851
- Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH (2006) *Cell* 126:107–120
- Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, Vercauteren K, Tiranti V, Zeviani M, Scarpulla RC, Chandel NS (2005) *Cell Metab* 1:409–414
- Carew JS, Huang P (2002) *Mol Cancer* 1:9–21
- Cuezva JM, Chen G, Alonso AM, Isidoro A, Misek DE, Hanash SM, Beer DG (2004) *Carcinogenesis* 25:1157–1163
- Cuezva JM, Krajewska M, de Heredia ML, Krajewski S, Santamaria G, Kim H, Zapata JM, Marusawa H, Chamorro M, Reed JC (2002) *Cancer Res* 62:6674–6681
- Cuezva JM, Ostronoff LK, Ricart J, López de Heredia M, Di Liegro CM, Izquierdo JM (1997) *J Bioenerg Biomembr* 29:365–377
- Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, Zhang CY, Krauss S, Ranger AM, Datta SR, Greenberg ME, Licklider LJ, Lowell BB, Gygi SP, Korsmeyer SJ (2003) *Nature* 424:952–956
- Dey R, Moraes CT (2000) *J Biol Chem* 275:7087–7094
- Di Liegro CM, Bellafiore M, Izquierdo JM, Rantanen A, Cuezva JM (2000) *Biochem J* 352:109–115

- DiMauro S, Schon EA (2001) *Am J Med Genet* 106:18–26
- Egea G, Izquierdo JM, Ricart J, San Martín C, Cuezva JM (1997) *Biochem J* 322:557–565
- Fliss MS, Usadel H, Caballero OL, Wu L, Buta MR, Eleff SM, Jen J, Sidransky D (2000) *Science* 287:2017–2019
- Garber K (2004) *J Natl Cancer Inst* 96:1805–1806
- Garber K (2006) *Science* 312:1158–1159
- Govindarajan B, Shah A, Cohen C, Arnold RS, Schechner J, Chung J, Mercurio AM, Alani R, Ryu B, Fan CY, Cuezva JM, Martinez M, Arbiser JL (2005) *J Biol Chem* 280:13936–13943
- Gross A, Pilcher K, Blachly-Dyson E, Basso E, Jockel J, Bassik MC, Korsmeyer SJ, Forte M (2000) *Mol Cell Biol* 20:3125–3136
- Habano W, Sugai T, Nakamura S, Uesugi N, Higuchi T, Terashima M, Horiuchi S (2003) *Oncol Rep* 10:1375–1380
- Harris MH, Vander Heiden MG, Kron SJ, Thompson CB (2000) *Mol Cell Biol* 20:3590–3596
- He QY, Chen J, Kung HF, Yuen AP, Chiu JF (2004) *Proteomics* 4:271–278
- Hervouet E, Demont J, Pecina P, Vojtkova A, Houstek J, Simonnet H, Godinot C (2005) *Carcinogenesis* 26:531–539
- Isidoro A, Casado E, Redondo A, Acebo P, Espinosa E, Alonso AM, Cejas P, Hardisson D, Fresno Vara JA, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M, Cuezva JM (2005) *Carcinogenesis* 26:2095–2104
- Isidoro A, Martinez M, Fernandez PL, Ortega AD, Santamaria G, Chamorro M, Reed JC, Cuezva JM (2004) *Biochem J* 378:17–20
- Izquierdo JM, Cuezva JM (1997) *Mol Cell Biol* 17:5255–5268
- Izquierdo JM, Cuezva JM (2000) *Biochem J* 346:849–855
- Izquierdo JM, Cuezva JM (2005) *Arch Biochem Biophys* 433:481–486
- Izquierdo JM, Jiménez E, Cuezva JM (1995a) *Eur J Biochem* 232:344–350
- Izquierdo JM, Luis AM, Cuezva JM (1990) *J Biol Chem* 265:9090–9097
- Izquierdo JM, Ricart J, Ostronoff LK, Egea G, Cuezva JM (1995b) *J Biol Chem* 270:10342–10350
- Jaattela M (2004) *Oncogene* 23:2746–2756
- Johannes G, Samow P (1998) *RNA* 4:1500–1513
- Kaelin WG Jr (2005) *Cell Metab* 1:357–358
- Kim JW, Dang CV (2006) *Cancer Res* 66:8927–8930
- Kim JY, Kim YH, Chang I, Kim S, Pak YK, Oh BH, Yagita H, Jung YK, Oh YJ, Lee MS (2002) *Oncogene* 21:3139–3148
- Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV (2006) *Cell Metab* 3:177–185
- Krebs R (1981) *Otto Warburg: cell physiologist, biochemist and eccentric*. Clarendon, Oxford, UK
- Lal A, Lash AE, Altschul SF, Velculescu V, Zhang L, McLendon RE, Marra MA, Prange C, Morin PJ, Polyak K, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Strausberg RL, Riggins GJ (1999) *Cancer Res* 59:5403–5407
- Lehninger AL (1970) *Biochemistry*. Worth Publishers, New York
- Lin MT, Beal MF (2006) *Nat Med* 12:1241–1243
- Lithgow T, Cuezva JM, Silver PA (1997) *Trends Biochem Sci* 22:110–113
- López de Heredia ML, Izquierdo JM, Cuezva JM (2000) *J Biol Chem* 275:7430–7437
- Luciakova K, Kuzela S (1992) *Eur J Biochem* 205:1187–1193
- Luis AM, Izquierdo JM, Ostronoff LK, Salinas M, Santarén JF, Cuezva JM (1993) *J Biol Chem* 268:1868–1875
- Martínez-Díez M, Santamaria G, Ortega AD, Cuezva JM (2006) *PLoS ONE* 1:e107
- Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM (2006) *Science* 312:1650–1653
- Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC (2000) *Nat Cell Biol* 2:318–325
- Matsuyama S, Xu Q, Velours J, Reed JC (1998) *Mol Cell* 1:327–336
- Mayor F, Cuezva JM (1985) *Biol Neonate* 48:185–196
- Mazzanti R, Solazzo M, Fantappie O, Elfering S, Pantaleo P, Bechi P, Cianchi F, Ettl A, Giulivi C (2006) *Am J Physiol: Gastrointest Liver Physiol* 290:G1329–G1338
- Meierhofer D, Mayr JA, Foetschl U, Berger A, Fink K, Schmeller N, Hacker GW, Hauser-Kronberger C, Kofler B, Sperl W (2004) *Carcinogenesis* 25:1005–1010
- Mootha VK, Bunkenborg J, Olsen JV, Hjerrild M, Wisniewski JR, Stahl E, Bolouri MS, Ray HN, Sihag S, Kamal M, Patterson N, Lander ES, Mann M (2003) *Cell* 115:629–640
- Neumann HP, Pawlu C, Peczkowska M, Bausch B, McWhinney SR, Muresan M, Buchta M, Franke G, Klisch J, Bley TA, Hoegerle S, Boedeker CC, Opocher G, Schipper J, Januszewicz A, Eng C (2004) *JAMA* 292:943–951
- Okamoto K, Shaw JM (2005) *Annu Rev Genet* 39:503–536
- Ortega AD, Cuezva JM (2005) In: Villarroya F (ed) *New frontiers in mitochondrial biogenesis and disease*. Research Signpost, Kerala, India, pp 111–139
- Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA, Dang CV (2000) *J Biol Chem* 275:21797–21800
- Ostronoff LK, Izquierdo JM, Cuezva JM (1995) *Biochem Biophys Res Commun* 217:1094–1098
- Ostronoff LK, Izquierdo JM, Enriquez JA, Montoya J, Cuezva JM (1996) *Biochem J* 316:183–191
- Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC (2006) *Cell Metab* 3:187–197
- Park SY, Chang I, Kim JY, Kang SW, Park SH, Singh K, Lee MS (2004) *J Biol Chem* 279:7512–7520
- Pedersen PL (1978) *Prog Exp Tumor Res* 22:190–274
- Pelletier J, Sonenberg N (1988) *Nature* 334:320–325
- Plas DR, Thompson CB (2002) *Trends Endocrinol Metab* 13:75–78
- Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK, Markowitz SD, Trush MA, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) *Nat Genet* 20:291–293
- Rathmell JC, Fox CJ, Plas DR, Hammerman PS, Cinalli RM, Thompson CB (2003) *Mol Cell Biol* 23:7315–7328
- Ricart J, Egea G, Izquierdo JM, San Martín C, Cuezva JM (1997) *Biochem J* 324:635–643
- Ricart J, Izquierdo JM, Di Liegro CM, Cuezva JM (2002) *Biochem J* 365:417–428
- Rojo G, Chamorro M, Salas ML, Vinuela E, Cuezva JM, Salas J (1998) *J Virol* 72:7583–7588
- Santamaria G, Martínez-Díez M, Fabregat I, Cuezva JM (2006) *Carcinogenesis* 27:925–935
- Sasaki R, Komaki R, Macapinlac H, Erasmus J, Allen P, Forster K, Putnam JB, Herbst RS, Moran CA, Podoloff DA, Roth JA, Cox JD (2005) *J Clin Oncol* 23:1136–1143
- Satrústegui J, Pardo B, del Arco A (2007) *Physiol Rev* 87:29–67
- Schieke SM, Phillips D, McCoy JP Jr, Aponte AM, Shen RF, Balaban RS, Finkel T (2006) *J Biol Chem* 281:27643–27652
- Schulz TJ, Thierbach R, Voigt A, Drewes G, Mietzner B, Steinberg P, Pfeiffer AF, Ristow M (2006) *J Biol Chem* 281:977–981
- Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, Gottlieb E (2005) *Cancer Cell* 7:77–85
- Semenza GL, Artemov D, Bedi A, Bhujwala Z, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Ravi R, Simons J, Taghavi P, Zhong H (2001) *Novartis Found Symp* 240:251–260
- Shin YK, Yoo BC, Chang HJ, Jeon E, Hong SH, Jung MS, Lim SJ, Park JG (2005) *Cancer Res* 65:3162–3170
- Tan DJ, Bai RK, Wong LJ (2002) *Cancer Res* 62:972–976
- Thierbach R, Schulz TJ, Isken F, Voigt A, Mietzner B, Drewes G, von Kleist-Retzow JC, Wiesner RJ, Magnuson MA, Puccio H, Pfeiffer AF, Steinberg P, Ristow M (2005) *Hum Mol Genet* 14:3857–3864
- Tomiya A, Serizawa S, Tachibana K, Sakurada K, Samejima H, Kuchino Y, Kitanaka C (2006) *J Natl Cancer Inst* 98:1462–1473

- Unwin RD, Craven RA, Harnden P, Hanrahan S, Totty N, Knowles M, Eardley I, Selby PJ, Banks RE (2003) *Proteomics* 3:1620–1632
- Vahsen N, Cande C, Briere JJ, Benit P, Joza N, Larochette N, Mastroberardino PG, Pequignot MO, Casares N, Lazar V, Feraud O, Debili N, Wissing S, Engelhardt S, Madeo F, Piacentini M, Penninger JM, Schagger H, Rustin P, Kroemer G (2004) *EMBO J* 23:4679–4689
- Valcarce C, Cuezva JM (1991) *FEBS Lett* 294:225–228
- Valcarce C, Navarrete RM, Encabo P, Loeches E, Satrustegui J, Cuezva JM (1988) *J Biol Chem* 263:7767–7775
- Valcarce C, Vitorica J, Satrustegui J, Cuezva JM (1990) *J Biochem (Tokyo)* 108:642–645
- Wallace DC (2005) *Annu Rev Genet* 39:359–407
- Wang X (2001) *Genes Dev* 15:2922–2933
- Warburg O (1930) *Metabolism of tumors*. Arnold Constable, London
- Warburg O (1956a) *Science* 124:269–270
- Warburg O (1956b) *Science* 123:309–314
- Warburg O (1966) Annual meeting of Nobelists at Lindau, Germany. English Edition by Dean Burk, National Cancer Institute, Bethesda, MD. <http://www.hopeforcancer.com/OxyPlus.htm>
- Yin PH, Lee HC, Chau GY, Wu YT, Li SH, Lui WY, Wei YH, Liu TY, Chi CW (2004) *Br J Cancer* 90:2390–2396
- Ziegler A, von Kienlin M, Decors M, Remy C (2001) *Cancer Res* 61:5595–5600

**QUANTITATIVE ASSESSMENT OF THE BIOENERGETIC SIGNATURE OF
CANCER**

Paloma Acebo^{1,5}, Daniel Giner^{1,5}, Piedad Calvo^{1,5}, Amaya Blanco-Rivero¹, Álvaro D. Ortega¹, Pedro L. Fernández², Giovanna Roncador³, Edgar Fernández-Malavé^{1,4}, Margarita Chamorro¹ and José M. Cuezva^{1,6}

1, Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, C.S.I.C.-U.A.M., Universidad Autónoma de Madrid, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, 28049 Madrid; 2, Departamento de Anatomía Patológica, IDIBAPS, Hospital Clínico y Universidad de Barcelona, 08036 Barcelona and 3, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, 28029 Madrid, Spain.

4, Present address: Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain.

5, Equally contributed to this work.

6, To whom correspondence should be addressed:

Prof. José M. Cuezva

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa,

Universidad Autónoma de Madrid,

28049 Madrid, Spain

Phone: 34 91 196 4618

Fax: 34 91 196 4420

E-mail: jmcuezva@cbm.uam.es

The transfer of results from the bench-side in benefit of the patients is usually hampered by the lack of adequate tools to implement such findings in the clinics. To bridge this gap, we report the development of monoclonal antibodies against proteins of the “bioenergetic signature” of the cell and their use in the quantification of these proteins in normal and tumor surgical specimens of breast, lung and esophagus. The results show the variable energetic demand of these tissues in a straightforward proteomic signature and illustrate that cancer vanishes the tissue-specific differences in the expression of markers of energetic metabolism.

Recent findings have shown that in various types of cancer the relative cellular expression of the bottleneck β -F1-ATPase protein of oxidative phosphorylation is significantly diminished when compared to its levels in the corresponding normal tissue (1-3). In certain types of carcinomas, the down-regulation of β -F1-ATPase is accompanied by an increased expression of some of the markers of the glycolytic pathway (1,3,4). This proteomic feature of cancer, that is fulfilled by more than 95% of the carcinomas analyzed in large cohorts of different tumors (2,3), defines a “bioenergetic signature” of potential clinical value as an indicator of disease progression in colon (1), lung (2,4) and breast (3) cancer patients. Furthermore, the bioenergetic signature also affords a predictive marker of the cellular response to chemotherapy (5). Indeed, the cell death response to chemotherapeutical agents highly correlated with both the activity of oxidative phosphorylation (6) and the expression of β -F1-ATPase (6,7). This study represents an effort to promote the translation of the knowledge about the bioenergetic signature of the cell into the clinical setting. First, we describe the production of monoclonal antibodies against the markers of the bioenergetic signature. Secondly, we show the application of these tools in quantitative assays to document the changes in the bioenergetic signature brought about by cancer of the breast, esophagus and lung.

The markers of the bioenergetic signature alluded above are β -F1-ATPase, the structural mitochondrial protein Hsp60 (heat-shock protein 60) and the enzymes of the glycolytic

pathway glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and the M-isoform of pyruvate kinase (PK) (1-3). Since the overall cellular activity of mitochondria results from both the numbers and the bioenergetic competence of the organelle, we also studied the normalized expression values of β -F1-ATPase per unit of structural mitochondrial protein (β -F1/Hsp60 ratio) and per unit of cellular protein (β -F1/GAPDH ratio). These two proteomic indexes inform of the mitochondrial competence and overall cellular activity of mitochondria, respectively (1-3). The latter ratio, also defined as the bioenergetic signature of the cell (1), is a gauge of the activity of aerobic glycolysis in carcinomas (4), a finding that links for the first time a proteomic index with the metabolic activity of the cancer cell.

To obtain the recombinant proteins to be used for immunization and as standards in quantitative assays, we first cloned the human cDNAs of these proteins (ATCC collection) into the pQE-TriSystem His-Strep 1(Qiagen) vector (see Supplemental Methods) so that the expressed proteins carry carboxy-terminal 6xHis- and Strep-tags. This enables the purification of the full-length proteins on Ni-NTA and/or on Strep-Tactin matrices. The soluble (Hsp60) and insoluble (β -F1-ATPase, GAPDH, PK) recombinant proteins were purified from cellular lysates on Strep-Tactin and Ni-NTA resins (Fig. 1A) and then used for mice immunization (see Supplemental Methods). Mice were sacrificed for the production of hybridomas only when a 10^4 dilution of the serum provided a strong positive response against the corresponding cellular protein on western blots (data not shown). For selection and preservation of positive hybrids, supernatants from the growing hybridomas were screened by indirect ELISA and western blotting. Only clones producing antibodies of high affinity and specificity against the human proteins in western blots (Fig. 1B) and in immunocytochemical techniques (Fig. 1C) were eventually chosen (see Supplemental Methods). The monoclonal antibodies produced were used for the development of quantitative slot-blot assays (Fig. 1D). The application of these procedures revealed a linear response for both the recombinant proteins and the cellular antigens (Fig. 1E), validating the assays for quantitative purposes.

The results in Table 1 summarize the cellular content of β -F1-ATPase, Hsp60, GAPDH

and PK as well as of the β -F1/Hsp60 and β -F1/GAPDH ratios in normal and tumor tissue of the lung, esophagus and breast. Of note, the content of the mitochondrial proteins in normal tissues was variable (breast > esophagus > lung; Table 1) most likely reflecting their differential energetic demand and dependence on the bioenergetic activity of mitochondria for provision of metabolic energy. Unsupervised hierarchical clustering of normal biopsies according to the expression pattern of bioenergetic signature proteins resulted in their distribution into two main groups (Fig. 2A). One group encompassed breast tissue only, and displayed high mitochondrial activity as revealed by the two ratios used to normalize β -F1-ATPase expression (Table 1). A second group, including the rest of the biopsies (Fig. 2A), showed a significantly lower content of β -F1-ATPase per cell (Table 1). The same analysis also illustrates the preferential clustering of normal lung biopsies into a subgroup different from esophageal ones (Fig. 2A), suggesting the existence of subtle differences in the bioenergetic phenotype of these tissues. Consistent with previous findings on altered expression level of these markers in cancer (1-4), we observed a significant decrease in the cellular amount of β -F1-ATPase in breast and esophageal carcinomas, as well as in adenocarcinomas and squamous carcinomas of the lung when compared to paired normal tissues (Table 1). In breast, the decrease in the bioenergetic signature results from a reduced cellular amount of β -F1-ATPase concurrent with an increase in the contents of Hsp60 and GAPDH (Table 1). These changes allowed the correct classification of normal and tumor breast biopsies by their bioenergetic signature (Fig. 2B). Likewise, in lung (Fig. 2C) and esophageal (Fig. 2D) cancer the bioenergetic signature also allows the correct classification of normal and tumor biopsies into two different groups with high specificity. It is possible that the tumor biopsies misclassified within the normal group (LAC15T in Fig. 2C and ESO33T in Fig. 2D) could be derived from patients in early stages of their disease, i.e., when the bioenergetic phenotype of the cell is still poorly affected (1-4). Of note, the mitochondrial competence (β -F1/Hsp60) and overall cellular activity of mitochondria (β -F1/GAPDH) of adenocarcinomas and squamous carcinomas of the lung are basically the same (Table 1). Overall, it appears that cancer alters the bioenergetic signature of the cell in a tissue-specific manner (Table 1), consistent with the variable cellular response that oncogenes (8,9) and

tumor suppressors (10) have on the phenotype of energetic metabolism. However, it is also noteworthy that the absolute amounts of most of the markers studied, as well as that of the bioenergetic signature, are basically the same for tumors regardless of their histological origin and type (Table 1). These findings strongly support our recent suggestion (4) that the bioenergetic signature of cancer illustrates the phenotype of energetic metabolism of proliferating cells.

Overall, we have developed a set of well validated monoclonal antibodies that could be used in a variety of proteomic assays (12) to quantify the bioenergetic signature of human tissues. We further document the utilization of these antibodies in assays that quantify the alterations of the proteins of energy metabolism brought about by cancer of the breast, esophagus and lung. The variability in the amount of these proteins within each tissue (Table 1) might result from differences in the areas of fibrosis, inflammation, lymphocytes or necrosis of the biopsies used for protein extraction. The normalized non-dimensional expressions of the content of β -F1-ATPase (β -F1/Hsp60 and β -F1/GAPDH ratios) could alleviate these differences. We show in a variety of tissues and histological subtypes that the metabolic biomarkers provide a clear-cut classification of normal and tumor biopsies, strongly supporting that alteration of energy metabolism represents “*the seventh hallmark*” of the cancer cell (11). Since the alteration of the bioenergetic signature directly correlates both *in vivo* and *in vitro* with the augmented metabolic demand of glucose in cells and tumors (4), we suggest that tests for the bioenergetic signature of the cell could also be implemented in the study of other human pathologies that impinge on mitochondrial malfunction.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank J. Satrústegui for comments. This work was supported by grants from Fina Biotech, S.L. and Ministerio de Educación y Ciencia (PET2005-0446), Ministerio de Sanidad y Consumo (PI041255), the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) y RET-2039 del ISCIII, Madrid and Comunidad de Madrid (S-GEN-0269), Spain. The CBMSO receives an institutional grant from Fundación Ramón Areces.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

P.A. designed and performed the cloning, expression and purification of the recombinant proteins. The following authors contributed in mice immunization (E.F.M. and P.C.), performed the fusions (G.R., D.G.) and screening of hybridomas (P.A., P.C., D.G., M.C. and G.R.), characterized the monoclonal antibodies developed (P.A., P.C., D.G. and M.C.) and quantify the expression of the markers in human tissues (P.C., A.B.R., A.D.O. and D.G.). P.L.F. performed the histological analysis and classification of the surgical specimens. D.G. and A.D.O. contributed in writing the paper. J.M.C. designed and supervised the project and wrote the paper.

REFERENCES

1. Cuezva, J.M. *et al. Cancer Res.* **62**, 6674-6681 (2002).
2. Cuezva, J.M. *et al. Carcinogenesis* **25**, 1157-1163 (2004).
3. Isidoro, A. *et al. Carcinogenesis* **26**, 2095-2104 (2005).
4. Lopez-Rios, F. *et al. Cancer Res.* **67**, 9013-9017 (2007).
5. Shin, Y.K. *et al. Cancer Res.* **65**, 3162-3170 (2005).
6. Matsuyama, S., Xu, Q., Velours, J. & Reed, J.C. *Mol. Cell* **1**, 327-336 (1998).
7. Santamaria, G., Martinez-Diez, M., Fabregat, I. & Cuezva, J.M. *Carcinogenesis* **27**, 925-935 (2006).
8. Ramanathan, A., Wang, C. & Schreiber, S.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**, 5992-5997 (2005).
9. Govindarajan, B. *et al. J. Clin. Invest.* **117**, 719-729 (2007).
10. Matoba, S. *et al. Science* **312**, 1650-1653 (2006).
11. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
12. Blow, N. *Nature* **447**, 741-744 (2007).

LEGEND TO FIGURES

Figure 1. Expression and purification of recombinant proteins and characterization of the monoclonal antibodies produced. **A)** The M15 *E. coli* strain was used for the expression of recombinant proteins. Samples were collected before (-) and after 2 h of 0.1 mM IPTG induction (+) and the cellular proteins analyzed by SDS-PAGE. The recombinant proteins were affinity purified using the streptavidin-tag (Hsp60) or the His-tag (β -F1 ATPase, GAPDH and PK) and the purity of the eluted protein estimated by SDS-PAGE (RP). **B)** Western blot analysis showing the reactivity of the different antibodies produced. The antibodies (0.4 μ g/ml) exclusively recognized the recombinant (RP) (1 ng of protein) as well as the native cellular protein in normal and/or tumor breast (B), esophagus (E), gastric (G) and lung (L) tissues or cell lines (HepG2) (10-30 μ g of protein). **C)** Immunofluorescence microscopy using the antibodies produced (0.4 μ g/ml) revealed (green) the mitochondrial (β -F1-ATPase and Hsp60) or cytoplasmic (GAPDH and PK) localization of the cellular proteins in human liver (HepG2) and breast (Hs578T) cancer cells. Nuclear DNA (blue) was stained with To-Pro. Representative images at 60x magnification are shown. **D)** Representative slot-blots with the antibodies produced for the quantification of the amount of the different biomarkers. A linear increase in the signal is observed as the amount of recombinant protein (RP in ng) or protein from cellular extracts (E in μ g) is augmented. **E)** Graphs of the experiments in **D** for both the recombinant protein (\circ , RP) and the cellular antigen (\blacksquare , CA) within the linear range of protein. The equations and correlation coefficients are: β -F1 ATPase [RP; $y = 1.7372x - 0.284 / R^2 = 0.9823$] [CA; $y = 0.7228x + 0.0542 / R^2 = 0.9571$], Hsp60 [RP; $y = 0.3224x - 0.0161 / R^2 = 0.9879$] [CA; $y = 0.4594x + 0.9 / R^2 = 0.9632$], GAPDH [RP; $y = 0.243x - 0.0404 / R^2 = 0.9804$] [CA; $y = 0.8742x + 0.1839 / R^2 = 0.992$] and PK [RP; $y = 0.6673x + 0.179 / R^2 = 0.9664$] [CA; $y = 1.3235x + 0.3378 / R^2 = 0.9803$].

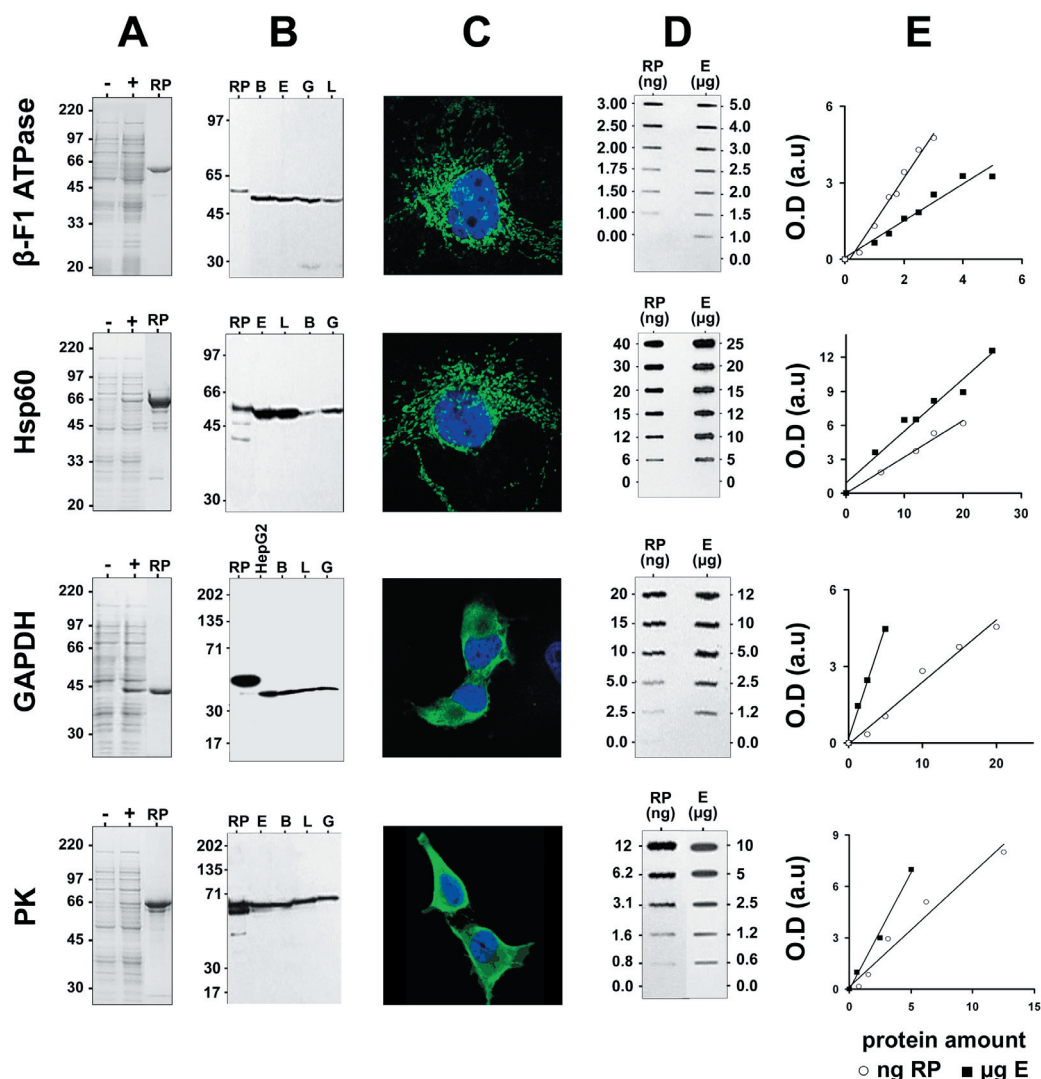


Figure 1 (Cuezva)

Figure 2. Graphical hierarchical clustering analysis of the bioenergetic signature as quantitatively determined by slot-blot procedures. Rows, type of sample; columns, proteins and derived ratios. Protein expression scores are shown normalized to normal lung samples in A and C, and to the corresponding normal tissue in B and D, according to a color scale: red, high; black, normal and green, low. The dendrogram (to the right of the matrix) represents overall similarities in expression profiles. **A**, Clustering of normal breast (B-N, light blue), lung (L-N, yellow) and esophageal (ESO-N, white) samples. **B**,

Clustering of normal (B-N, light blue) and adenocarcinomas (B-T, dark blue) of the breast. **C**, Clustering of normal (L-N, yellow) and adenocarcinomas (LAC-T, dark orange) and squamous carcinomas (LSC-T, light orange) of the lung. **D**, Clustering of normal (ESO-N, white) and squamous carcinomas (ESO-T, grey) of the esophagus.

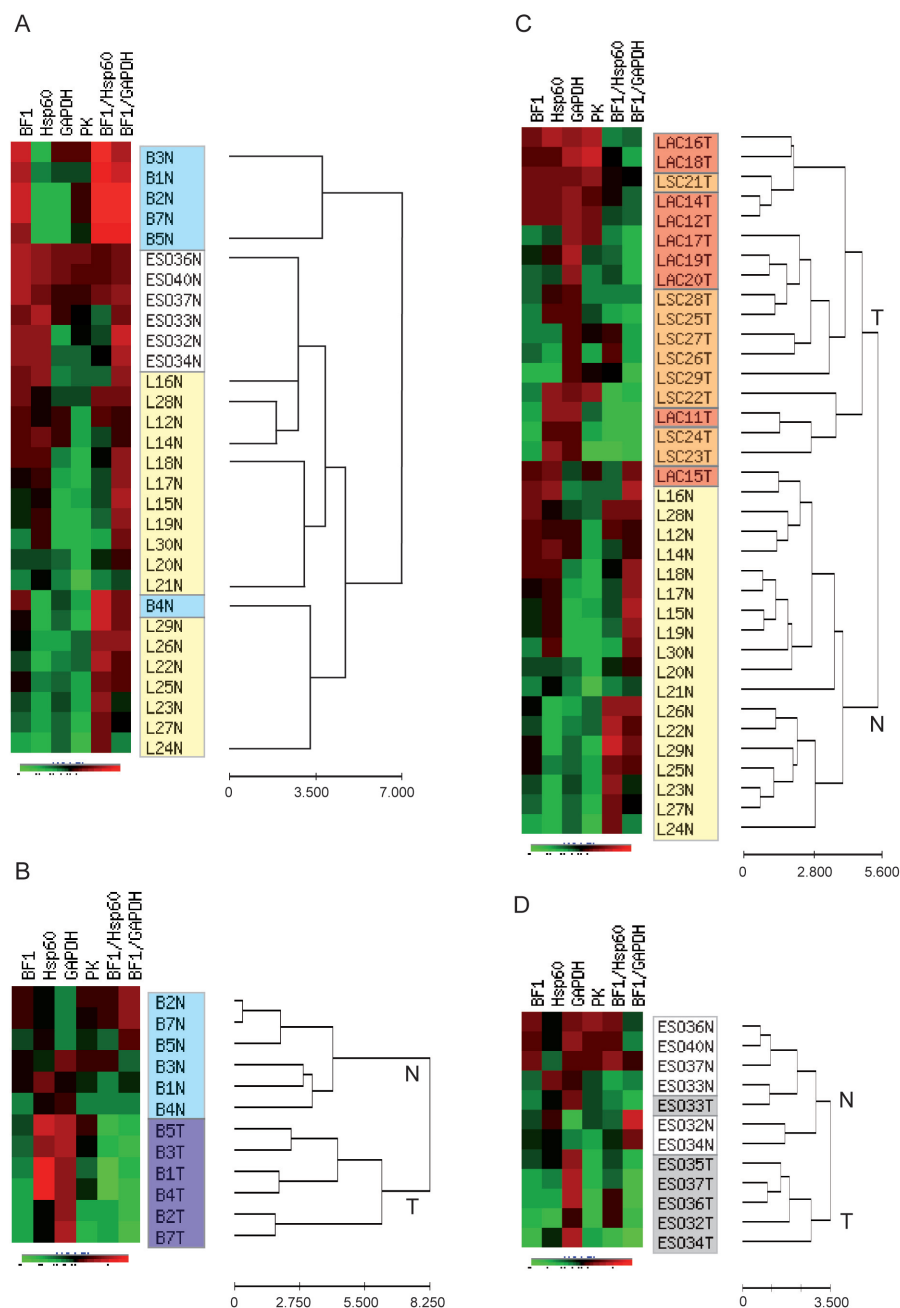


Figure 2 (Cuezva)

Table 1. Protein content of metabolic biomarkers in paired normal and tumor samples of the breast, esophagus and lung. The protein content of β -F1-ATPase (β -F1), Hsp60, GAPDH and PK is expressed in ng per μ g of total cellular protein. The ratios derived are dimensionless. The number of biopsies in each group are shown in parenthesis. The results shown are the mean \pm SEM. Bold typed text and * indicate a significance of $P < 0.05$ or less by Student's t test when compared with paired normal samples or normal breast biopsies, respectively.

Tissue	Biopsy	β -F1	Hsp60	GAPDH	PK	β -F1/Hsp60	β -F1/GAPDH
Lung	Normal (18)	1.11 \pm 0.12*	0.12 \pm 0.02*	0.29 \pm 0.03	0.49 \pm 0.07	18.02 \pm 3.55	4.60 \pm 0.58
-	Adeno. (9)	1.43 \pm 0.28	0.25 \pm 0.05	0.94 \pm 0.12	1.22 \pm 0.41	5.63 \pm 0.78	2.18 \pm 0.86
-	Squamous (9)	0.77 \pm 0.28	0.18 \pm 0.04	0.51 \pm 0.02	0.55 \pm 0.19	6.01 \pm 1.65	1.54 \pm 0.49
Esophagus	Normal (6)	3.36 \pm 0.56*	0.36 \pm 0.04*	0.54 \pm 0.14	1.73 \pm 0.39	9.57 \pm 1.89	8.48 \pm 1.87
	Squamous (6)	1.85 \pm 0.25	0.34 \pm 0.08	1.09 \pm 0.10	1.44 \pm 0.65	6.94 \pm 1.26	1.80 \pm 0.27
Breast	Normal (6)	6.10 \pm 0.98	0.03 \pm 0.01	0.31 \pm 0.11	1.51 \pm 0.25	264.33 \pm 61.69	39.14 \pm 13.95
	Adeno. (6)	2.26 \pm 0.45	0.34 \pm 0.13	2.37 \pm 0.39	0.98 \pm 0.29	14.70 \pm 4.75	1.11 \pm 0.20

HuR and the Bioenergetic Signature of Breast Cancer: A Low Tumor Expression of the RNA Binding Protein Predicts a Higher Risk of Disease Recurrence.

Álvaro D. Ortega ^{1,2}, Sandra Sala¹, Enrique Espinosa³, Manuel González-Barón³ and José M. Cuezva^{1,2,4}

¹Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM,

²CIBER de Enfermedades Raras, ³Servicio de Oncología Médica, Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain.

Running title: HuR and Expression of β -F1-ATPase in Breast Cancer

⁴Author to whom correspondence should be addressed:

Prof. José M. Cuezva
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
Universidad Autónoma de Madrid
28049 Madrid, Spain.
Phone: 34 911 964 618
Fax: 34 911 964 420
E-mail: jmcuezva@cbm.uam.es

ABSTRACT

Purpose: Down-regulation of the catalytic subunit of the mitochondrial H⁺-ATP synthase (β -F1-ATPase) is a molecular hallmark that underlies the abnormal aerobic glycolysis of carcinomas. The expression of β -F1-ATPase is stringently controlled by post-transcriptional mechanisms. Herein, we pursue the identification of β -F1-ATPase mRNA binding proteins (β -RNABPs) that interact and could define the bioenergetic phenotype of the cancer cell and to establish its relevance as markers of breast cancer progression.

Experimental Design: An RNA-affinity chromatography strategy and other molecular and cellular biology techniques were applied for the identification, localization and analysis of the implication of β -RNABPs in β -F1-ATPase expression. Expression of β -RNABPs was assessed by western blot in 89 breast cancer biopsies from a retrospective cohort. β -RNABP protein expression was correlated with relapse-free survival in multivariate analysis.

Results: HuR is a β -RNABP that interacts with the 3'UTR of the transcript also localizing with mitochondria. The increased expression of HuR in breast carcinomas correlates ($P < 0.001$, χ^2 test) with the progressive alteration of the bioenergetic phenotype of carcinomas. However, over-expression of HuR does not affect the expression of β -F1-ATPase nor affect its relative rate of protein synthesis. Nevertheless, HuR is an independent marker of breast cancer prognosis. A low tumor expression of HuR predicts a higher risk of cancer recurrence in patients in the early-stages of the disease as assessed by clinical and bioenergetic markers of prognosis.

Conclusions: The results support the incorporation of HuR as an additional protein marker of the bioenergetic signature for the diagnosis and clinical follow-up of breast cancer patients.

INTRODUCTION

The metabolic reprogramming of cancer is nowadays established at both the molecular and functional levels. A conserved feature describing the energetic phenotype of most human tumors when compared to paired non-tumor tissues is that the expression of the catalytic subunit of the H⁺-ATP synthase (β -F1-ATPase), a bottle-neck in the provision of metabolic energy by mitochondrial oxidative phosphorylation, is significantly reduced and linked to a concurrent increase in the expression of markers of the glycolytic pathway (1-4). The proteomic index that relates markers of both energy-generation pathways defines a “bioenergetic signature” that quantitatively informs of the rates of glucose utilization by the cell or tissue (5). In addition, the “bioenergetic signature” of colon (1), lung (5, 6) and breast (3) tumors provides relevant markers of cancer prognosis. Moreover, it has been suggested that the metabolic trait of the cancer cell, as revealed by its bioenergetic signature, could afford a predictive marker of the cellular response to chemotherapy and a new target for cancer therapy (7-9).

Several interpretations have been put forward to explain the “aberrant” glycolytic phenotype of the cancer cell ((4) and references therein). More recently (5), we have suggested that the shift in the energetic phenotype of tumors illustrates the re-entrance of the cells of that particular tissue into the cell cycle because proliferation involves the repression of the bioenergetic activity of mitochondria (10, 11) and is energetically supported by glycolysis (12). However, the specific molecular mechanisms that trigger the down-regulation of the mitochondrial β -F1-ATPase in the cancer cell still remain to be determined (4). In this regard, the expression of β -F1-ATPase during development of the liver (13-16), progression through the cell cycle (11) and in liver carcinogenesis (4, 17) has been shown to be regulated by post-transcriptional mechanisms that affect the subcellular localization, the stability and the translation of the mRNA. The 3'UTR of β -F1-ATPase mRNA (β -mRNA) is essential for efficient translation of the transcript (15, 18) due to its activity as internal ribosome entry site (19). It appears that translation masking of the mRNA (4, 15, 17) is due to the binding of β -RNABPs to the 3'UTR of the transcript which presumably hamper the essential role of the 3'UTR in translation.

The AU-rich element (ARE) binding protein HuR is a central regulator of post-transcriptional gene expression (20). The activity and sub-cellular localization of HuR is tightly regulated during the cell cycle (21, 22) and HuR in turn regulates the expression of cell cycle relevant proteins such as cyclins A and B1 (21) and p21 (23). Cellular stresses (24, 25) and/or the phosphorylation of HuR (22) promote the translocation of the protein to the cytoplasm where HuR binds and stabilizes

its target RNAs. Moreover, HuR expression is increased in most human cancers (26) and its increased cytoplasmic localization has been related to a poor outcome in breast (27), ovarian (28, 29) and gastric (30) cancer patients. Several RNAs that code for mitochondrial proteins have been identified as HuR-interacting mRNAs in a high throughput screening (31). More recently, a study has documented the interaction of HuR with the ARE of the 3'UTR of β -mRNA (32).

Because of the pivotal role played by HuR in post-transcriptional regulation of gene expression, in this study we first addressed the possible interaction of HuR with β -mRNA at both the molecular and cellular levels. The results illustrate that HuR interacts and co-localizes with the transcript in mitochondria of various mammalian cell types. Second, we studied the putative functional role of HuR in defining the bioenergetic phenotype of the cancer cell. The results obtained indicate that HuR does not play a major direct role in post-transcriptional control of β -F1-ATPase expression. Finally, we studied the association of HuR expression with the alteration of the bioenergetic phenotype of breast cancer in a retrospective cohort of patients (3). The results showed that HuR is an independent marker of breast cancer prognosis and that a reduced total expression of HuR in the carcinomas predicts a higher risk of disease recurrence.

MATERIALS AND METHODS

Tissue specimens and clinical information of patients. Frozen tissue sections obtained from surgical specimens of eighty-nine patients who had an operation for invasive breast carcinoma at the Hospital Universitario La Paz between 1991 and 2000 were used (3). Patients' medical records were reviewed, and identifiers coded to protect patient confidentiality. The Institutional Review Board approved the project. Patients who received chemotherapy or radiotherapy before surgery were excluded from the study. Table S1 (in Supplementary Material) provides a summary of the clinical characteristics of the cohort of patients analyzed as well as of the expression level of HuR in each clinical group. For more details about clinical data and treatments applied to the patients see (3).

Protein extraction and Western blot analysis. Cryostat sections (~50-60 mg wet weight) were homogenized and solubilized in a buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 2 % CHAPS, 1 % DTT, 1% ampholines (pI 3-10, GE Healthcare), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM EDTA and a complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH) (3) and the solubilized protein was used for western blot analysis as in (3). The antibodies used in this study included: mouse monoclonal against HuR (3A2, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at a dilution 1:400; rabbit polyclonal against PABP1, kindly provided by Dr. A. Nieto (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid) used at 1:1,000; rabbit anti- β -F1-ATPase at a dilution 1:20,000 (1); mouse monoclonal anti-hsp60 (SPA 807, Stressgene, Victoria, Canada) at a dilution 1:2,000, anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at a dilution 1:15,000 (Abcam, Cambridge, U.K.) and anti-tubulin at 1/5,000 (B512, Sigma) and goat polyclonal anti-PK at a dilution 1:1,000 (Abcam, Cambridge, U.K.).

Cell cultures. Human embryonic kidney (HEK 293) and hepatocarcinoma (HepG2) cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS. Normal rat kidney (NRK) cells were grown in DMEM supplemented with 5% FCS. Cells were cultured at 37° C and 7.5% CO₂ up to ~ 80% confluence. Cells were scrapped off from the plates after two PBS washes.

Immunoprecipitation of RNA. Cellular extracts (~10⁷ cells) were prepared after cross linking of the cells with 1% HCHO in PBS for 10 min at room temperature with gentle shaking. After, the cells were incubated with 0.25M Gly in PBS for 5 min at room temperature. Cellular pellets were resuspended in RIPA buffer (0.25M NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% NaDOC in 50mM Tris-HCl pH 8.0) supplemented with protease inhibitors, sonicated (four 15 sec pulses at maximum power) and left on ice for 5 min. Extracts were centrifuged at 12,000xg for 15min

at 4°C and the resulting supernatant incubated at 4° C with protein A or G-sepharose pre-coated with specific antibodies for 1.5 h. The antibodies used for RNA-immunoprecipitation were: HuR (3A2) and AUF1 (HnRNP D1) both from Santa Cruz (Santa Cruz, CA), GAPDH from Abcam (Cambridge, UK) and AKAP149 from BD Biosciences (Palo Alto, CA). After formation of the immune complexes, the resin was washed 3 times with RIPA and 3 times with HSR buffer (1M NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% NaDOC, 1M Urea, 1mM EDTA in 50mM Tris-HCl, pH 8.0). The reversion of the chemical cross linking and elution of the immunoprecipitated material was carried out by incubating in a buffer containing 5mM EDTA, 10mM DTT, 1% SDS and 50mM Tris-HCl pH 8, for 45 min at 70 ° C. The RNA was extracted from the samples using the RNeasy kit (QIAGEN) and precipitated using Glycoblue as a carrier (Ambion, Austin, TX). For cDNA synthesis, 1µg of RNA (input) or all the RNA immunoprecipitated were used as templates using 2.5µM of random hexamers, 40 U of RNase inhibitor and 5U of MuLV reverse transcriptase (Roche, Mannheim, Germany). PCRs we carried out using as template 1/10 of the volume of the cDNA and the following primers: for β -F1-ATPase, h β -fw: cagcagatttggcaggtg and h β -rv: cttcaatgggtcccaccata; for GAPDH, GAPDH-fw: agccacatcgctcagacac and GAPDH-rv: gcccaatacgaccaaattcc; for HMGCR, HMGCR-fw: gacgcaacctttatatccgtt and HMGCR-rv: ttgaaagtgtttctctgtaccc.

Affinity purification of HuR. For the purification of RNA-binding proteins we have adapted a previously described affinity chromatography method (33). Cellular extracts were prepared after washing the cells with RLN buffer (140 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1mM DTT in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4). The recovered cells were counted before lysing them on ice (20 million cells/ml) in RLN-T buffer (RLN buffer supplemented with 0.5% Triton X-100 and the cocktail of protease inhibitors EDTA-free (Roche, Mannheim, Germany) for 5 min. Nuclei and cell debris were removed by centrifugation (5 min at 800xg) at 4°C. The post-nuclear extract was freeze/thawed three times and centrifuged for 15 min at 12,000xg. Samples were stored at -70°C until used after the addition of glycerol to a final concentration of 5%. The hybrid RNAs used as baits were produced by *in vitro* transcription (T7 MEGAscript kit, Ambion) of plasmids that contained the human β -mRNA full-length (h β -fl), β 3 sequence (16) or 3'UTR of β -mRNA (18, 19) upstream the DNA coding for the phage MS2 coat protein binding sites (33). Protein extracts (~ 12-16 mg in 2 ml) were incubated with 0.1 nmol of the hybrid RNAs for 1h at 4°C. After, 1nmol of purified MBP-MS2 coat protein was added and incubated for an additional h. The complexes were recovered on 0.2 ml of amylose (New England Biolabs, Ipswich; MA). The resin was extensively washed with RLN buffer before elution of RNABPs with RNase A (10 µg/ml) and with maltose (100 mM). In a set of

experiments, cellular extracts were UV cross linked to the hybrid RNA (16) before the addition of the hybrid MBP-MS2 coat protein. In this situation, the resin was sequentially washed with RLN buffer (twice), RLN supplemented with 0.3 M NaCl (one) and RLN supplemented with 1% Nonidet before the elution with RNase and maltose. Proteins were precipitated from the different fractions and blotted with antibodies against HuR and PABP1 as above indicated.

Statistical Analysis. Distributions of molecular markers were compared by Student's *t* test. Pearson's coefficients were used for linear correlation studies. To determine the association between the expression levels of HuR with disease-free survival (DFS) a value of 0.7 was used as cut point to define "high" and "low" expression groups. The cutoff point was established at the mean value of HuR expression in breast tumors that reveal a low deviation from the normal bioenergetic signature (n=54) (see L+M signature in reference (3)). Disease-free survival was defined as the interval between the date of surgery and the date of tumor recurrence. Survival curves were derived from Kaplan-Meier estimates and compared by log-rank test. Cox proportional hazards regression methods were used for multivariate disease-free survival analysis. Hazard ratios are presented with their 95% confidence intervals (95% CI). Statistical tests were two-sided at the 5% level of significance.

RESULTS

HuR is a β -F1-ATPase mRNA binding protein. Exponentially growing HEK (Fig. 1A) and HepG2 (Fig. 1B) cells were processed for immunoprecipitation with antibodies against several RNABPs in order to assess the putative interaction of any of these proteins with β -mRNA. The immunoprecipitates (IPs) were subsequently analyzed by PCR for the presence of β -mRNA (Fig. 1A,B). Western blots of the IPs (Fig. 1A, upper panels) illustrated that the antibodies used immunoprecipitate their respective antigens with different efficiencies. The lower panel in Fig. 1A shows that β -mRNA was detectable in the IPs of HuR while it was non-detectable in the IPs produced with antibodies against other RNABPs (AUF1, GAPDH and AKAP149). The β -mRNA was also amplified in HuR IPs when using other human (HepG2) (Fig. 1B) and rat (NRK) cell lines (data not shown). The lack of amplification of other cellular mRNAs (GAPDH in Fig. 1A and HMGCRC in Fig. 1B) suggested that HuR specifically interacts with β -mRNA within the cellular context.

HuR interacts *in vitro* with the 3'UTR of β -F1-ATPase mRNA. The interaction between β -mRNA and HuR was further confirmed in *in vitro* assays. For this purpose, we developed chimeric RNAs using sequences of β -mRNA and the RNA hairpins that are bound by the coat-protein of phage MS2 (hRNA in Fig. 1C), following a previously described strategy (33). The developed RNAs consisted on the full-length β -mRNA (h β -fl), the regulatory 3'UTR of β -mRNA (3'UTR) and a region of the ORF of β -mRNA (β 3) that does not interact with cellular proteins (16). The hybrid RNAs were incubated with extracts derived from HEK cells and the putative RNA-protein complexes formed were subsequently retained on amylose columns by means of a fusion protein (MBP-CP) that contained the maltose-binding protein (MBP, able to bind amylose) and the MS2 coat-protein (CP, able to bind the RNA hairpins) (Fig. 1C). The RNA binding proteins (RBPs in Fig. 1C) were specifically eluted from the column by digestion of the hybrid RNA with RNase A (Fig. 1C).

Fig. 1D shows the specific detection of HuR in the eluted proteins when the hRNA used as bait contained the 3'UTR of β -mRNA. The specificity of this interaction is illustrated by the lack of immunoreactivity when the purification scheme omitted the inclusion of a hybrid RNA (Φ in Fig. 1D) or the RNA included as bait does not interact with cellular proteins (β 3 in Fig. 1D). Moreover, an antibody against another abundant cellular RNABP such as PABP did not react with the eluted proteins (Fig. 1D) indicating the specific interaction of HuR with the 3'UTR of β -mRNA. It is interesting to note that the amount of HuR eluted from the column when the full length β -mRNA

was used as bait was much less than that when using the 3'UTR of β -RNA (Fig. 1D) suggesting that secondary structures of the RNA could partially mask the HuR-binding-element in the 3'UTR of the transcript. Overall, these results indicate that HuR binds the human 3'UTR of β -mRNA in agreement with a recent report (32).

HuR interacts, co-fractionates and co-localizes with β -F1-ATPase ribonucleoprotein complex (β -RNP). In rat liver, β -mRNA is contained in a large β -RNP complex attached to the outer mitochondrial membrane (16, 34). The specificity of the interaction between HuR and the 3'UTR of β -mRNA was further shown in rat NRK cells (Fig. 2A). In these studies, the 3'UTR was covalently attached to its interacting proteins by UV radiation before proceeding to purification (35). Fig. 2A shows that HuR is retained on the column after high-stringent washing conditions (see W2 and W3 in Fig. 2A) and is eluted only after RNase A digestion of the hybrid RNA used as bait (see RNase in Fig. 2A). These results strongly suggest that HuR and the 3'UTR of β -mRNA were specifically interacting at the time of UV irradiation.

In rat liver, the β -RNP complex is a large rounded-shaped structure of ~ 150 nm in diameter that co-fractionates with mitochondria on sucrose gradients at a high-density (16). Consistent with the reported interaction between HuR and β -mRNA (Figs. 1 and 2A), we found that a fraction of HuR co-fractionated with β -mRNA (Fig. 2B) and mitochondria as revealed by the partitioning of β -F1-ATPase protein in gradient fractions (Fig. 2B). However, HuR also localized to other fractions of the gradient suggesting its involvement in the formation of additional RNP complexes (36, 37).

High-resolution immunoelectron microscopy of human liver thin sections (Fig. 2C) and of the gradient fractions containing partially purified β -RNP complexes (Fig. 2D) allowed the identification of HuR in the vicinity of mitochondria (see gold particles in Fig. 2C) and in electron-dense rounded-shape structures attached to mitochondria (see gold particles in Fig. 2D) (16, 34), strongly suggesting the involvement of HuR in the localized post-transcriptional expression of mammalian β -mRNA.

HuR and the bioenergetic signature of breast cancer. The interaction of HuR with the 3'UTR of β -mRNA, an essential regulatory element required for efficient translation of the transcript (15, 18, 19), suggested that HuR might be controlling the expression of the mitochondrial protein and thus, partially responsible for promoting the altered bioenergetic signature that characterizes most neoplasia syndromes (1, 2) and specifically that of breast cancer (3). For this reason, we first determined the expression of HuR in parallel with the markers of the bioenergetic signature in normal and tumor biopsies obtained from the same patients operated from breast ductal invasive

adenocarcinomas (Fig. 3A). Remarkably, we observed that the expression of HuR is barely detectable in normal samples whereas its expression is highly increased in the tumors (Fig. 3A). Next, we studied the relationship of HuR with the bioenergetic phenotype of breast cancer in a retrospective cohort of 89 breast carcinomas previously characterized from the point of view of the bioenergetic signature and for which the clinical and follow-up information of the patients were available (3). Hierarchical clustering of breast carcinomas by the expression level of markers of the bioenergetic signature (3) generated three different groups of carcinomas establishing the *Low (L)*, *Medium (M)* and *Highly (H)* divergent phenotypes from the normal breast bioenergetic phenotype (see Figs. 1 and 3 in reference (3)). Interestingly, HuR expression correlated with the bioenergetic L, M and H signature of the carcinomas ($P < 0.001$, χ^2 test). Consistent with this finding, the expression level of HuR discriminated two different groups of carcinomas with significantly different expression levels of the relevant markers (β -F1-ATPase, Hsp60 and GAPDH) of the bioenergetic signature (Fig. 3B), in such a way that a high expression of HuR was associated with a high deviation from the normal breast bioenergetic phenotype (drop in β -F1-ATPase concurrent with increased Hsp60 and GAPDH expression) (Fig. 3B and see reference (3)). In contrast to these findings, it is of interest to note that HuR expression did not correlate with clinical-pathological markers relevant for tumor progression such as nodal affectation ($P = 0.225$, χ^2 test), clinical stage ($P = 0.063$, χ^2 test) and histological grade ($P = 0.487$, χ^2 test).

HuR is an independent marker of breast cancer progression. Univariate analysis showed that lymph node involvement ($P = 0.001$), a stage disease ($P = 0.001$) and grade of differentiation ($P = 0.041$) were the clinical-pathological variables significantly associated with progression of the disease. Similarly, Kaplan-Meier survival analysis revealed that a low tumor expression of HuR predicted a worse prognosis for breast cancer patients (Fig. 3C). Interestingly, the tumor expression level of HuR also provided a relevant marker of cancer progression in low-risk patients as assessed both by clinical-pathological markers and by the bioenergetic signature of the tumor (Table 1). In fact, it was observed that the five-year distant disease-free survival in low-risk patients (as determined by clinical-pathological factors and the bioenergetic signature) was significantly reduced if HuR expression was low (Table 1). The same happened in high-risk patients (β -cluster C2 in Table 1 and see reference (3)), although there were very few patients in this last subgroup. Multivariate Cox regression survival analysis using the clinical-pathological and bioenergetic markers previously shown to predict disease progression revealed that a low expression of HuR is an independent marker of prognosis (Table 2). Each multivariate analysis performed included three

molecular markers and one clinical variable (see C, D and E in table 2) because nodal status, clinical stage and histological grade are not independent variables (see A in table 2).

The over-expression of HuR does not influence the post-transcriptional expression of β -F1-ATPase. Contrary to our expectations, we found that the over-expression of HuR in cells of mammals (Fig. S1A) did not affect the cellular expression of β -F1-ATPase protein (Fig. S1A) nor significantly altered the relative expression of its mRNA (Fig. S1B). Moreover, analysis of GFP expression driven from a reporter that contains the 3'UTR of β -mRNA (11), both by western blot (Fig. S1C, histogram to the right) or by FACS analysis (Fig. S1C, histogram to the left), revealed that HuR over-expression did not significantly affect gfp expression in contrast with a recent suggestion (32). Furthermore, and consistent with the above findings (Fig. S1A and S1B), we observed that the *in vivo* relative rate of β -F1-ATPase synthesis in cells over-expressing HuR was not significantly different from that observed in control transfected cells (Fig. S1D, histogram to the right). However, it should be noted that HuR over-expression significantly diminished the global rates of cellular protein synthesis when compared to control transfected cells (Fig. S1D, histogram to the left). Overall, the results suggest that HuR plays an indirect role in controlling the expression of the mitochondrial β -F1-ATPase protein.

DISCUSSION

The RNA binding protein HuR has been shown to play a pivotal epigenetic role in post-transcriptional regulation of its targeted genes. This is specially relevant in situations where the cellular abundance of the protein is increased, such as in human cancers (26) and under the stress conditions that operate in cancer cells (20, 22, 24, 37). In this work, we show that HuR specifically binds the 3'UTR of human and rat β -mRNA and that it co-localizes with the large β -RNP associated with mitochondria in rat liver. Since the subcellular localization (16, 38), the stability (14, 17) and translation (4, 11, 13, 15) of β -mRNA are tightly regulated in a variety of cellular processes including development, oncogenesis and the cell cycle it would initially appear that HuR represents a key candidate for the regulation of the expression of β -F1-ATPase and thus, in defining the altered bioenergetic phenotype of the cancer cell (1-6). Indeed, we do find in this work that the expression level of HuR in breast tumors correlates with the progressive alteration of the bioenergetic signature of the cancer cell. Moreover, HuR adds prognostic information to that provided by clinical-pathological factors and by the bioenergetic signature. However, HuR over-expression experiments revealed no apparent effect of the protein on the post-transcriptional expression of β -F1-ATPase aside from a general effect of HuR as global regulator of cellular protein synthesis suggesting that *in vivo* there may be accessory proteins which cooperate with HuR to modulate β -F1-ATPase expression.

The 3'UTR of β -mRNA is a key controlling element of the translation of the transcript very much acting both *in vitro* (15) and *in vivo* (18) as a translation enhancer because it is endowed with internal-ribosome-entry-site activity (IRES) (19), i.e., it is able to interact and recruit the translational machinery. The repression of β -mRNA translation in fetal rat liver (15) and in hepatomas (17) is triggered by the binding of regulatory proteins to the 3'UTR of the mRNA interfering in this way with its role in translation (4, 15). In these situations, the bioenergetic function of mitochondria is compromised (4, 15, 17) as it has been observed in most human cancers (1-3, 5). The identification of HuR as a 3'UTR β -mRNA binding protein, in agreement with a recent report (32), raised a first relevant question regarding the actual role of HuR in post-transcriptional regulation of β -F1-ATPase expression in the cancer cell. Knock-down experiments of HuR by siRNA apparently promote a slight reduction on the cellular expression level of β -F1-ATPase protein that has been attributed to changes in the rate of β -mRNA translation (32). However, HuR over-expression experiments, as it is observed in most human tumors ((31) and see Fig. 3), indicated that a large increase in the cellular abundance of HuR does not affect the expression of the endogenous β -F1-

ATPase at both the protein and mRNA levels (see Fig. S1A and S1B in Supplementary Material). Moreover, HuR over-expression did not promote significant changes on the *in vivo* relative rates of synthesis of the β -F1-ATPase protein as assessed both by the incorporation of ^{35}S -methionine into the immunoprecipitated protein (see Fig. S1D in Supplementary Material) or from the expression of GFP driven from reporters bearing the 3'UTR of β -mRNA (see Fig. S1C in Supplementary Material). These results strongly argue against the possibility that binding of HuR to the 3'UTR of β -mRNA could impede the IRES-mediated translation of the transcript as has been documented for other mRNAs whose IRES-mediated translation is negatively regulated by HuR (35, 39).

A large amount of HuR targeted genes have been identified (31) and characterized to date (25, 39, 40). In addition, HuR has been shown to function either as a positive or negative regulator of gene expression (41). Since HuR is a broad-spectrum RNABP that binds the 3'UTR of β -mRNA our findings do not preclude that it could be supporting events for the correct post-transcriptional expression of the β -F1-ATPase gene in a more complex background requiring the participation of additional proteins of the β -RNP (36). In agreement with this suggestion it appears that the relevant β -mRNA binding proteins involved in translation masking of β -mRNA (15, 17) have a molecular mass above 50 kDa and poly A binding activity (42). Alternatively, it is possible that HuR could participate in defining the bioenergetic phenotype of the cancer cell because of its negative impact on the global rates of cellular protein synthesis (Fig. S1D). If this is the situation, we have to presume that HuR preferentially limits by yet unknown mechanisms the synthesis of mitochondrial *versus* other cellular proteins. Whatever the situation, the challenged ahead in the scenario of the β -RNABPs that control the expression of β -mRNA, and thus participate in defining the bioenergetic phenotype of the cancer cell, is the development and implementation of further genetic and/or proteomic approaches to identify the β -mRNA operon (36).

The over-expression of HuR in most human cancers (26) as well as the potential utility of HuR as a marker of cancer prognosis (27-29) has been documented. Most of these studies have evaluated HuR expression in the tumors by immunohistochemistry (IHC) and found that an increased cytoplasmic immunostaining of the protein predicts a worse prognosis for the patients (27-29). Recently, IHC has been questioned for the evaluation of the expression of markers of cancer prognosis (43). We have evaluated the total cellular expression level of HuR in breast tumors by western blot and confirmed, in agreement with previous works by IHC (27-29) that HuR expression is a marker of cancer prognosis. However, our results indicate that a low total expression of HuR in the tumor predicts a worse prognosis for breast cancer patients (Table I). This finding might

initially appear contradictory with the observation that an increased cytoplasmic expression of HuR is an unfavorable predictor of disease progression (27-29). However, changes in the sub-cellular localization of HuR are not necessarily coupled to changes in the cellular expression of the protein (21, 25, 44). In fact, changes in the sub-cellular localization of HuR represent an early response to different sorts of stresses (20, 24, 37, 45) and the cytoplasmic translocation of HuR is tightly controlled during the cell cycle (21, 22).

Genetic, pharmacologic and/or environmental changes that interfere with the production of biological energy trigger a rapid change in the bioenergetic phenotype of the cell. Adaptation to hypoxia, to an increased O₂ availability at the time of birth and a shift in the carbon source of the culture medium provide few examples of short-term regulated changes in the bioenergetic phenotype of the cell. Moreover, metabolic reprogramming seems to be a necessary step required to progress during the cell cycle (11) and a necessary response of the cancer cell to survive and to progress into malignancy (8, 46). The bioenergetic phenotype of the cell could be assessed by a proteomic index (BEC index) that informs of the relative activity of the two pathways involved in cellular energetic metabolism (1). The BEC index has recently been shown to correlate both *in vivo* and *in vitro* with the rates of glucose capture and utilization by aerobic glycolysis in human carcinomas (5). Further, the BEC index is highly sensitive for the discrimination of normal and tumor biopsies (3, 6), and a valuable tool for the prognosis of colon (1), lung (5, 6) and breast (3) cancer patients, as well as to predict the response to chemotherapy in colon (7) and liver (8) cancer cells. Although the mechanistic aspects of the relationship that exists between HuR expression and the bioenergetic signature of breast tumors still requires future investigations it is clear from this study that HuR may be used as an additional marker for the prognosis of breast cancer patients. Indeed, we show that HuR and the markers of the bioenergetic signature are independent predictors of breast cancer outcome. Moreover, they are also independent markers of well established clinical-pathological markers of breast cancer prognosis contributing to determine those patients with a high risk of recurrence when in the early stages of their disease. Overall, these findings strongly support the inclusion of HuR as an additional proteomic marker in the future translational development of clinical tests for the bioenergetic signature of breast cancer.

HuR plays a central role in carcinogenesis through the regulation of the expression of genes involved in cellular proliferation, invasion, anti-apoptotic effects, angiogenesis and evasion of immune recognition (47). Therefore, the development of chemotherapeutic strategies aimed at controlling the function of HuR in human tumors might have clinical utility. In this regard, it has

been shown that the activation of AMP kinase (which is the sensor of metabolic stress in normal cells and an upstream event that regulates HuR activity) by AICAR treatment inhibits proliferation of cancer cells by promoting cell cycle arrest at the G1-S transition (48). Overall, we support that the improvement of the clinical follow up of breast cancer patients requires additional studies aimed at establishing the set of proteins that participate with HuR in the de-arrangement of the bioenergetic phenotype during cancer progression.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. R. Reed (Harvard Medical School) for kindly providing the plasmids that allowed the implementation of techniques for the purification of RNABPs. Dr. K.S. Kosik (University of California) and M.T. Rejas (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa) are acknowledged for providing the β -galactosidase plasmid and for contributing in EM studies, respectively. The authors are indebted to members of the Oncopaz group (Hospital Universitario La Paz, Madrid). A.D.O. and S.S. were supported by pre-doctoral fellowships from FPU-Ministerio de Educación y Ciencia (A.D.O.) and the Universidad Autónoma de Madrid and Università de Palermo (S.S.), respectively. This work was supported by grants from the Ministerios de Sanidad (PI041255), Educación y Ciencia (BFU07-65253/BMC), Comunidad de Madrid (S-GEN-0269) and Fundación Mutua Madrileña. The CBMSO receives an institutional grant from Fundación Ramón Areces, Spain.

REFERENCES

1. Cuezva JM, Krajewska M, de Heredia ML, et al. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 2002;62:6674-81.
2. Isidoro A, Martinez M, Fernandez PL, et al. Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J* 2004;378:17-20.
3. Isidoro A, Casado E, Redondo A, et al. Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* 2005;26:2095-104.
4. Cuezva JM, Sanchez-Arago M, Sala S, Blanco-Rivero A, Ortega AD. A message emerging from development: the repression of mitochondrial beta-F1-ATPase expression in cancer. *J Bioenerg Biomembr* 2007;39:259-65.
5. Lopez-Rios F, Sanchez-Arago M, Garcia-Garcia E, et al. Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res* 2007;67:9013-7.
6. Cuezva JM, Chen G, Alonso AM, et al. The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis* 2004;25:1157-63.
7. Shin YK, Yoo BC, Chang HJ, et al. Down-regulation of mitochondrial F1F0-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance. *Cancer Res* 2005;65: 3162-70.
8. Santamaria G, Martinez-Diez M, Fabregat I, Cuezva JM. Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Carcinogenesis* 2006;27:925-35 .
9. Tomiyama A, Serizawa S, Tachibana K, et al. Critical role for mitochondrial oxidative phosphorylation in the activation of tumor suppressors Bax and Bak. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1462-73.
10. Sakamaki T, Casimiro MC, Ju X, et al. Cyclin d1 determines mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biol* 2006;26:5449-69.
11. Martinez-Diez M, Santamaria G, Ortega AD, Cuezva JM. Biogenesis and dynamics of mitochondria during the cell cycle: Significance of 3'UTRs. *PLoS ONE* 2006;1:e107.
12. Wang T, Marquardt C, Foker J . Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation. *Nature* 1976;261:702-5.
13. Luis AM, Izquierdo JM, Ostronoff LK, Salinas M, Santarén JF, Cuezva JM. Translational regulation of mitochondrial differentiation in neonatal rat liver. Specific increase in the translational efficiency of the nuclear-encoded mitochondrial beta-F1-ATPase mRNA. *J Biol Chem* 1993;268:1868-75.

14. Izquierdo JM , Ricart J, Ostronoff LK, Egea G, Cuezva JM. Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of beta-F1-ATPase gene expression during mitochondrial biogenesis in liver. *J Biol Chem* 1995;270:10342-50.
15. Izquierdo JM , Cuezva JM. Control of the translational efficiency of beta-F1-ATPase mRNA depends on the regulation of a protein that binds the 3' untranslated region of the mRNA. *Mol Cell Biol* 1997;17:5255-68.
16. Ricart J, Izquierdo JM, Di Liegro CM, Cuezva JM. The assembly of the ribonucleoprotein complex containing the mRNA of the β -subunit of the mitochondrial H⁺-ATP synthase requires the participation of two distal *cis*-acting elements and a complex set of cellular *trans*-acting proteins. *Biochem J* 2002;365:417-28.
17. López de Heredia M, Izquierdo JM, Cuezva JM. A conserved mechanism for controlling the translation of beta-F1-ATPase mRNA between the fetal liver and cancer cells. *J Biol Chem* 2000;275:7430-37.
18. Di Liegro CM , Bellafore M, Izquierdo JM, Rantanen A, Cuezva JM. 3'-Untranslated regions of oxidative phosphorylation mRNAs function in vivo as enhancers of translation. *Biochem J* 2000;352:109-15.
19. Izquierdo JM , Cuezva JM. Internal-ribosome-entry-site functional activity of the 3'-untranslated region of the mRNA for the beta subunit of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Biochem J* 2000;346:849-55.
20. Levy NS, Chung S, Furneaux H, Levy AP. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 1998;273:6417-23.
21. Wang W, Caldwell MC, Lin S, Furneaux H, Gorospe M. HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *EMBO J* 2000;19:2340-50.
22. Abdelmohsen K, Pullmann R Jr, Lal A, et al. Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell* 2007;25:543-57.
23. Wang W, Furneaux H, Cheng H, et al. HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Mol Cell Biol* 2000;20:760-9.
24. Yaman I, Fernandez J, Sarkar B, et al. Nutritional control of mRNA stability is mediated by a conserved AU-rich element that binds the cytoplasmic shuttling protein HuR. *J Biol Chem* 2002;277:41539-46.
25. Wang W, Fan J, Yang X, et al . AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR. *Mol Cell Biol* 2002;22:3425-36.
26. Lopez de Silanes I, Fan J, Yang X, et al. Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis. *Oncogene* 2003;22:7146-54.
27. Heinonen M, Bono P, Narko K, et al. Cytoplasmic HuR expression is a prognostic factor in invasive ductal breast carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:2157-61.

28. Denkert C, Weichert W, Pest S, et al. Overexpression of the embryonic-lethal abnormal vision-like protein HuR in ovarian carcinoma is a prognostic factor and is associated with increased cyclooxygenase 2 expression. *Cancer Res* 2004;64:189-95.
29. Erkinheimo TL, Lassus H, Sivula A, et al. Cytoplasmic HuR expression correlates with poor outcome and with cyclooxygenase 2 expression in serous ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:7591-4.
30. Mrena J, Wiksten JP, Thiel A, et al. Cyclooxygenase-2 is an independent prognostic factor in gastric cancer and its expression is regulated by the messenger RNA stability factor HuR. *Clin Cancer Res* 2005;11:7362-8.
31. Lopez de Silanes I, Zhan M, Lal A, Yang X, Gorospe M. Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2987-92.
32. Izquierdo JM. Control of the ATP synthase beta subunit expression by RNA-binding proteins TIA-1, TIAR, and HuR. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;348:703-11.
33. Zhou Z, Licklider LJ, Gygi SP, Reed R. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* 2002;419:182-85.
34. Egea G, Izquierdo JM, Ricart J, San Martín C, Cuezva JM. mRNA encoding the beta-subunit of the mitochondrial F1-ATPase complex is a localized mRNA in rat hepatocytes. *Biochem J* 1997;322:557-65.
35. Meng Z, King PH, Nabors LB, et al. The ELAV RNA-stability factor HuR binds the 5'-untranslated region of the human IGF-IR transcript and differentially represses cap-dependent and IRES-mediated translation. *Nucleic Acids Res* 2005;33:2962-79.
36. Keene JD, Tenenbaum SA. Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol Cell* 2002;9:1161-7.
37. Kedersha N, Anderson P. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* 2002; 30:963-9.
38. Ricart J, Egea G, Izquierdo JM, San Martín C, Cuezva JM. Subcellular structure containing mRNA for beta subunit of mitochondrial H⁺-ATP synthase in rat hepatocytes is translationally active. *Biochem J* 1997;324:635-43.
39. Kullmann M, Gopfert U, Siewe B, Hengst L. ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Genes Dev* 2002;16:3087-99.
40. Kawai T, Lal A, Yang X, Galban S, Mazan-Mamczarz K, Gorospe M. Translational control of cytochrome c by RNA-binding proteins TIA-1 and HuR. *Mol Cell Biol* 2006;26:3295-307.
41. Katsanou V, Papadaki O, Milatos S, et al. HuR as a negative posttranscriptional modulator in inflammation. *Mol Cell* 2005;19:777-89.

42. Izquierdo JM, Cuezva JM. Epigenetic regulation of the binding activity of translation inhibitory proteins that bind the 3' untranslated region of beta-F1-ATPase mRNA by adenine nucleotides and the redox state. *Arch Biochem Biophys* 2005;433:481-6.
43. McCabe A, Dolled-Filhart M, Camp RL, Rimm DL. Automated quantitative analysis (AQUA) of in situ protein expression, antibody concentration, and prognosis. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1808-15.
44. Denkert C, Weichert W, Winzer KJ, et al. Expression of the ELAV-like protein HuR is associated with higher tumor grade and increased cyclooxygenase-2 expression in human breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:5580-6.
45. Mazan-Mameczarz K, Galban S, Lopez de Silanes I, et al. RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8354-9.
46. Pelicano H, Xu RH, Du M, et al. Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism. *J Cell Biol* 2006;175:913-23.
47. Lopez de Silanes I, Lal A, Gorospe M. HuR: post-transcriptional paths to malignancy. *RNA Biol* 2005;2:11-3.
48. Rattan R, Giri S, Singh AK, Singh I. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2005;280:39582-93.

Table 1. Univariate disease-free survival analysis of breast cancer patients stratified by total tumor HuR expression levels. Breast cancer patients in the early stages of the disease, as assessed both by clinical and bioenergetic markers that were shown to be significant predictors of disease progression (3), were selected to study the association of HuR expression and patient outcome by Kaplan-Meier univariate disease-free survival analysis. *Low* and *High* HuR expression groups were defined as indicated in M&M section. No, indicates the number of patients in each group. Events identify the number of patients with recurrence of the disease in that particular group. The cumulated proportion of 5-years distant disease-free survival (DFS) with its S.E.M. and the 95% confidence interval (CI) are shown. P-value was determined by log-rank test. The small group of high-risk breast cancer patients identified by an abnormal high expression level of β -F1-ATPase in the tumor (β -cluster C2 and see (3)) was also included in the study.

	Parameter	HuR	No	%	Events	5-y distant DFS. (prop.)	SEM	95% CI	P
<i>Clinical</i>	Nodes 0-3	Low	33	45	11	0.67	0.09	0.50 0.84	0.024
		High	40	55	5	0.87	0.05	0.77 0.98	
	Stage I + II	Low	32	46	10	0.69	0.09	0.52 0.86	0.021
		High	38	54	4	0.89	0.05	0.79 0.99	
	Grade 1 + 2	Low	14	42	5	0.79	0.11	0.57 1.00	0.028
		High	19	58	1	0.95	0.05	0.85 1.05	
<i>Bioenergetic</i>	L+M	Low	32	59	13	0.59	0.09	0.41 0.77	0.012
		High	22	41	2	0.91	0.06	0.79 1.03	
	β-cluster C2	Low	9	53	7	0.14	0.13	-0.11 0.39	0.034
		High	8	47	3	0.75	0.15	0.46 1.04	

Table 2. Multivariate disease-free survival analysis. Proportional multivariate Cox regression analysis were performed with molecular markers (B) shown to be significant in univariate analysis and in different combinations with clinical markers (C, D and E) because the latter were not independent variables (A). The hazard ratio (H.R.) and the 95% confidence interval are shown. P-value was determined by Wald test. N.S., not significant when $P > 0.05$.

Covariate		H.R.	95% CI		P
A	Nodes				N.S.
	Stage				N.S.
	Grade				N.S.
B	HuR-Low	3.23	1.40	7.74	0.006
	β -cluster-C2	3.78	1.63	8.75	0.002
	GAPDH-high	2.35	1.01	5.49	0.048
C	HuR-Low	3.72	1.43	9.72	0.007
	β -cluster-C2	3.47	1.48	8.15	0.004
	GAPDH-high	2.17	0.86	5.47	0.102
	Nodes				0.005
	1-3 vs. 0	1.79	0.60	5.36	0.297
	> 3 vs. 0	5.61	1.91	16.5	0.002
D	HuR-Low	3.94	1.50	10.3	0.005
	β -cluster-C2	3.49	1.49	8.14	0.004
	GAPDH-high	2.16	0.87	5.36	0.097
	Stage				0.007
	I vs. III				N.S.
	II vs. III	0.24	0.10	0.58	0.002
E	HuR-Low	4.51	1.68	12.2	0.003
	β -cluster-C2	3.11	1.19	8.09	0.020
	GAPDH-high	2.93	1.16	7.40	0.023
	Grade				N.S.

LEGEND TO FIGURES

Figure 1. HuR interacts with human β -F1-ATPase mRNA. **A** and **B**, Extracts from human HEK (A) and HepG2 (B) cells were immunoprecipitated with antibodies against different RNA-binding-proteins (RBPs) (AKAP149, HuR, AUF1 and GAPDH) and the corresponding protein identified by western blot in the immunoprecipitates (IP) (upper panel in A). RNA from the immunoprecipitates and from the starting material (input) was extracted and β -mRNA detected by PCR. GAPDH (A) and HMGCR (B) mRNAs were also amplified to illustrate the specificity of the RNA-protein interaction. Note the specific co-immunoprecipitation of β -mRNA with HuR in both cell lines. **C** and **D**, HuR was purified using a tagged- β -mRNA affinity chromatography method that is based on the utilization of a hybrid RNA (hRNA) built by the MS2-coat protein binding sites (in grey) and the RNA targets of interest (in black) for binding of the corresponding RNABPs (RBPs, circles). The RNA was then bound by a fusion protein (castle shape form) made of the MS2-coat-protein (CP, door of castle) and the maltose-binding-protein (MBP, tower of castle) so that the RNA-protein complex formed could be anchored on an amylose column (grey inverted crown). The proteins bound to hRNA were specifically eluted by digestion of the RNA used as bait with RNase A. In **D**, the affinity purified proteins were subjected to western blot for the detection of HuR and PABP1, the latter an abundant cellular RNABP used as a control of the specificity of the purification procedure. Φ and $\beta 3$, respectively indicate the absence of hRNA and presence of $\beta 3$ hRNA in the purification scheme. $\beta 3$ is a sequence region of β -mRNA that does not interact with cellular proteins (16). 3'UTR and β -fl identify purifications in which hRNA contained the 3'UTR and the full-length β -F1-ATPase mRNA.

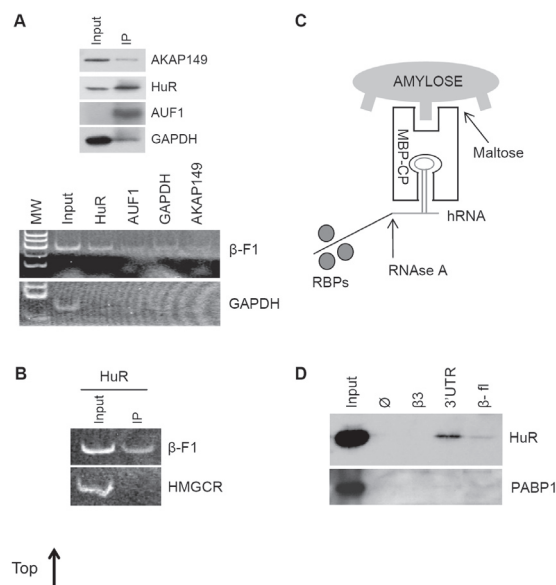


Figure 2: HuR forms part of the β -RNP complex that co-localizes with mitochondria. **A**, HuR specifically interacts with the full-length β -mRNA in rat NRK cells. The *in vitro* synthesized rat β -mRNA linked to the MS2 stem-loops was incubated with protein extracts from NRK cells and UV cross linked before proceeding to affinity purification of RNABPs (see Fig. 1C). The immobilized complexes were subsequently washed with various stringencies (W1 and W4, RLN buffer; W2, RLN buffer + 0.3 M NaCl; W3, RLN buffer + 1% Nonidet P-40) and finally eluted first with RNase A and after with maltose. Aliquots of the different fractions were analyzed by western blot with an antibody against HuR. **B**, Co-localization of β -mRNA, mitochondria and a fraction of HuR in rat liver. Fetal rat liver post-nuclear extracts were fractionated on 24-54% sucrose gradients and aliquots of the fractions (1 to 18) analyzed by nucleic acids hybridization procedures for the presence of β -mRNA (β -F1 mRNA) and by western blot for the identification of the partitioning of HuR and mitochondria (β -F1 protein) in the gradient. The fractionation of the soluble PK and α -tubulin proteins is also shown to illustrate the separation behavior of the gradient. **C** and **D**, High resolution immunogold labeling of HuR (10 nm gold) in ultrathin sections of human normal liver (**C**) and in fraction 7 of the sucrose gradients (**D**) illustrate the presence of HuR localizing in the periphery of human mitochondria (mt in **C**) and in round-shaped electron-dense structures in close proximity of rat liver mitochondria (**D**). Scale bars in **C** and **D**: 200 nm; 100 nm in the insets of **D**.

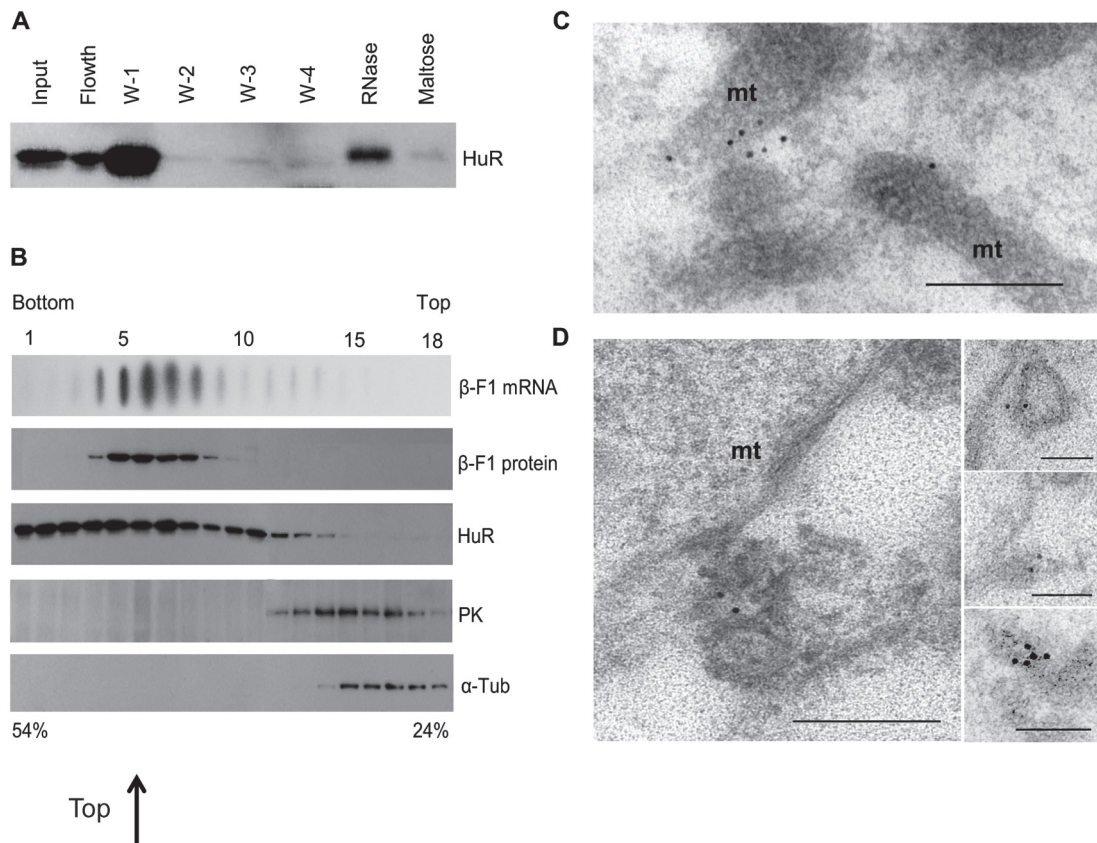
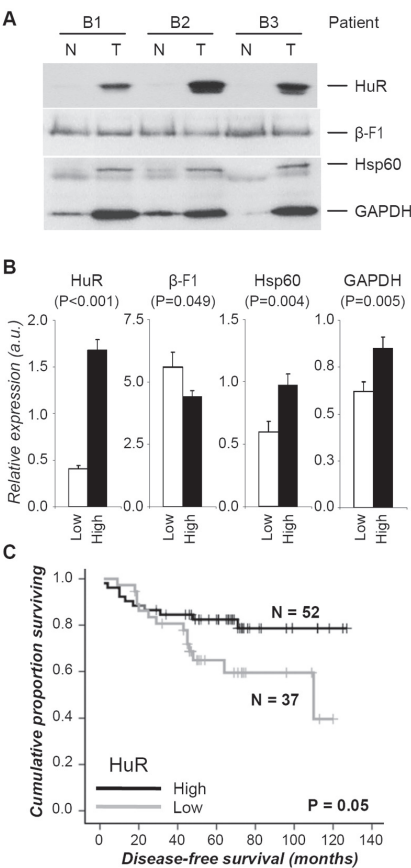


Figure 3. HuR is over-expressed in breast cancer and provides a marker of tumor progression.

A, Protein samples from normal (N) and tumor (T) breast biopsies were taken from the same patient (B1-B3) and analyzed by western blot for the total expression levels of HuR and of markers of the bioenergetic signature (β -F1-ATPase, Hsp60 and GAPDH). A representative example obtained with three patients is shown. **B**, Association of HuR expression levels with the markers of the bioenergetic signature in 89 primary breast ductal invasive adenocarcinomas (3). *Low* and *High* HuR expression groups were defined as indicated in M&M section. The mean \pm S.E.M. expression values of the markers in each group and P-values for these comparisons by Student's *t*-test are indicated. A *Low* total HuR expression in the carcinoma significantly correlates with a low deviation of the bioenergetic signature of the carcinomas as assessed by the expression levels of β -F1-ATPase, Hsp60 and GAPDH. **C**, Kaplan-Meier disease-free survival analysis for 89 breast cancer patients stratified by the expression level of HuR in the carcinoma. The plot shows a significant association of low HuR expression levels with a poor outcome for the patients. The log-rank test P-value is shown.



Top ↑

Supplementary Material.

Fractionation of rat liver extracts on sucrose gradients. Liver homogenates were prepared from adult and fetal albino Wistar rats as indicated previously in detail (16). Post-nuclear supernatants were layered on 24-54% (w/v) sucrose density gradients and centrifuged at 145,000xg for 70 min at 4°C. Fractions (2 ml) were collected from the bottom of the tube at a constant flow rate and processed either for western blotting and/or nucleic acid hybridization procedures (16).

High-resolution immunoelectron microscopy. Human (1) and rat liver samples (34) and gradient fractions (16) were processed for EM as described. After quenching of the free aldehyde groups by immersion in 50 mM NH₄Cl in PBS the samples were embedded in Lowicryl K4M (16). Gold interference ultrathin sections were collected in Formvar/carbon-coated nickel grids. Observation was performed with a JEOL 1010 electron microscope at 80kV accelerating voltage. The subcellular distribution of HuR immunoreactive material was studied in the sections. Briefly, grids were transferred to droplets of anti-HuR (1:2 dilution) for 60 min at room temperature and after extensive washing incubated with goat anti-mouse IgG+IgM complexed to 10 nm gold particles (BioCell, Research Laboratories) (16). Standard controls for immunocytochemical techniques were conducted in parallel to assess the specificity of the immunoreactive signals (34) (16).

mRNA quantification. Cytoplasmic RNA was extracted with RNeasy mini kit (QUIAGEN) following the manufacturer instructions. RNA quality was assessed by electrophoresis. 1 µg of RNA was retro-transcribed with High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). qPCR was carried out on three different RT reactions and on one RT-minus control reaction. Each reaction included 5 ng of cDNA used as a template, 0.5 µM of each primer and FastStart TaqMan Probe Master mix (Roche Applied Sciences), 0.1 µl of the corresponding probe (Universal Probe Library, Roche Applied Science): #14 for β-F1-ATPase and #60 for GAPDH (that was used as reference for normalization purposes). qPCR protocol was 1 cycle of denaturation (95°C 10 min) and 40 cycles of amplification (95°C 15 sec, 60°C 1 min and fluorescence acquisition). The amplification efficiency for each primer was empirically determined and applied to the relative quantification (ΔΔCt method) of the data using qbase software (<http://medgen.ugent.be/qbase/>).

Cellular transfections and reporter assays. For HuR over-expression experiments 3x10⁵ cells were seeded 24h prior transfection. 3µg of plasmids containing HuR (pCMV-Sport6), β-galactosidase (kindly provided by Dr. Kosik) or pcDNA (mock) were transfected using Plus and Lipofectamine reagents (Invitrogen). Cells were scrapped 24 to 48h after transfection. For GFP-reporter experiments, plasmids containing GFP with the 3'UTR of β-F1-ATPase mRNA (GFP-3'β)

(11) were co-transfected at 1/10 with regard to HuR or pcDNA plasmids. After transfection, cells were recovered and processed for western blot and flow cytometry. 20,000 events were analysed by flow cytometry in a FACScalibur (BD Biosciences) and data analysis were carried out with Cell Quest software for Mac.

***In vivo* determination of the rates of protein synthesis.** Twenty four h after transfection of HEK cells with HuR or β -gal plasmids, the cells were subjected to metabolic labelling followed by immunoprecipitation. In brief, 70% confluent cells were incubated for 20 min in a Met and Cys depleted culture medium followed by 30 min incubation in a culture medium containing 130 μ Ci/ml 35 S-Met/Cys Promix (GE Healthcare). The cells were then scrapped, washed twice with cold PBS and processed for immunoprecipitation as described in Methods section. The antibodies used for immunoprecipitation were rabbit polyclonal anti- β -F1-ATPase (1) and mouse monoclonal anti-Hsp60 (SPA-807, Stressgene). The immunoprecipitates were fractionated on SDS-PAGE and processed for fluorography. The relative rate of β -F1-ATPase synthesis was determined by normalizing the incorporation of the radioactive tracer into the β -F1-ATPase protein relative to that incorporated into the mitochondrial Hsp60 used as control. The incorporation of radioactivity into total TCA precipitable proteins was also determined (14).

Table S1: Summary of the clinical-pathological characteristics and tumor HuR expression level in the cohort of patients studied. *No.* indicates the number of breast biopsies in each group.

Tumor histological subtypes: *D* and *L*, for invasive ductal and lobular carcinoma, respectively; *Others*, mostly mixed invasive and lobular carcinomas. The expression levels of HuR is expressed in arbitrary units as the mean \pm SEM.

Characteristic	No.	%	HuR
Age, years			
<50	30	34	1.12 \pm 0.17
>50	59	66	1.17 \pm 0.11
Histology			
D	73	82	1.23 \pm 0.10
L	10	11	0.77 \pm 0.13
Others	6	7	0.85 \pm 0.47
No. Nodes			
0	46	52	1.14 \pm 0.13
1-3	27	30	1.07 \pm 0.16
>3	16	18	1.32 \pm 0.23
Size			
≤ 20 mm	31	35	1.10 \pm 0.13
> 20 mm	58	65	1.18 \pm 0.12
Stage			
I	18	20	1.22 \pm 0.19
II	52	58	1.09 \pm 0.12
III	19	21	1.27 \pm 0.20
Grade			
1	9	10	0.89 \pm 0.22
2	24	27	1.24 \pm 0.20
3	41	46	1.28 \pm 0.14
N/A	15	17	0.80 \pm 0.19

Figure S1. The over-expression of HuR does not affect the synthesis of β -F1-ATPase. HEK cells overexpressing either HuR, β -galactosidase (β -Gal) or transfected with an empty pcDNA3 plasmid (Mock) were recovered and analyzed for protein (**A**), RNA (**B**) or GFP reporter (**C**) expression and for the *in vivo* β -F1-ATPase synthesis (**D**). **A**, A representative example of the expression of β -F1-ATPase (β -F1) and HuR is shown in two mock and three HuR cell transfection experiments. Two different protein loads (10 and 20 μ g) are shown for the controls to assess the sensitivity of the antibody in the western blot. The results show that the over-expression of HuR has no effect on β -F1-ATPase expression levels. **B**, Over-expression of HuR does not promote significant changes in the relative amount of β -mRNA. β -F1-ATPase mRNA relative expression was determined by RT-qPCR using GAPDH as a reference gene. Results are the mean \pm S.E.M. of three experiments. **C**, HuR over-expression does not alter the expression of GFP-3' β reporter. HEK cells were co-transfected with HuR or pcDNA plasmid and a reporter construct of GFP fused to the 3'UTR of β -mRNA. GFP levels were determined both by flow cytometry analysis (FACS) and by western blot (WB). Results are the mean \pm S.E.M. of three experiments. **D**, Twenty four h after transfection, HEK cells were subjected to short-term metabolic labelling with 35 S-methionine. Cells were then processed for immunoprecipitation with pre-immune (lane 1) or immune antibodies (lanes 2-8) against β -F1-ATPase and Hsp60. Protein precipitates were fractionated on SDS-PAGE and processed for fluorography. A representative experiment is shown that illustrates the specific immunoprecipitation of the labelled β -F1 and Hsp60 in one mock (lane 2), three β -Gal (lanes 3-5) and three HuR (lanes 6-8) expressing cells assayed in the same gel. HuR over-expression does not affect the relative rate of β -F1-ATPase synthesis (histogram to the right). The results shown are the means \pm S.E.M. of three experiments. The histogram to the left shows that HuR over-expression significantly reduces the global rate of cellular protein synthesis. The results shown are the means \pm S.E.M. of 3 experiments. *, $P < 0.01$ by Student's t test when compared to β -Gal.

